

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**



**EFFECTO DEL TNF- $\alpha$  E IL-1 $\beta$  EN LA EXPRESIÓN DE IL-10 VÍA WT1 EN  
CÉLULAS DE CARCINOMA DE PULMÓN HUMANO A549**

**POR**

**L.B.G. JUAN MANUEL IZAGUIRRE ALVAREZ**

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRÍA  
EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN INMUNOBIOLOGÍA**

**Junio, 2020**



EFFECTO DEL TNF- $\alpha$  E IL-1 $\beta$  EN LA EXPRESIÓN DE IL-10 VÍA WTI EN CÉLULAS DE  
CARCINOMA DE PULMÓN HUMANO A549

COMITÉ DE TESIS

---

Dr. Pablo Zapata Benavides  
Director de Tesis

---

Dr. Edgar Mendoza Gamboa  
Secretario

---

Dr. Ricardo Alberto Gómez Flores  
Vocal

---

Dr. Moisés Armides Franco Molina  
Vocal

---

Dr. Santiago Saavedra Alonso  
Vocal



EFECTO DEL  $\text{TNF-}\alpha$  E  $\text{IL-1}\beta$  EN LA EXPRESIÓN DE  $\text{IL-10}$  VÍA  $\text{WT1}$  EN  
CÉLULAS DE CARCINOMA DE PULMÓN HUMANO A549

DIRECCIÓN DE TESIS

---

Dr. Pablo Zapata Benavides  
Director de Tesis

---

Dra. Mariela Arellano Rodríguez  
Asesor Externo

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por brindarme el apoyo económico que me permitió cumplir mis estudios.

Al Laboratorio de Inmunología y Virología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León, a la Doctora Cristina Rodríguez Padilla por permitirme realizar mis estudios en su organización.

Agradezco al Doctor Pablo Zapata Benavides, por abrirme las puertas a su equipo, por ser mi mentor en esta etapa de mi vida, por escucharme y ser un gran ejemplo a seguir. Gracias por tantas enseñanzas académicas y personales.

A Mariela, por siempre creer en mí y ayudarme a ser mejor investigador. Gracias por tu paciencia y tu amistad.

Al Doctor Santiago Saavedra, Doctor Edgar Mendoza, Doctor Ricardo Gómez y Doctor Moisés Franco, por su apoyo en la realización de este proyecto. Por siempre estar ahí para aconsejarme como parte de mi comité y dar dirección a este trabajo.

A mis padres, por supuesto. Por forjar a esta persona en quien me he convertido. Los amo.

A tía Glo, por siempre apoyarme y enseñarme que nada vale más que un gran corazón.

A mi hermano, Car. Por ser un ejemplo que seguir, por escucharme cuando lo necesito. Te quiero tanto hermano.

A Kenya, por nunca soltarme la mano. Por tu presencia, por hacerme feliz y darme el impulso para creer en mí. Por compartir tantos momentos conmigo.

A mi familia que siempre me dio su cariño, mis hermanas Karla, Paola, Thali, Nury... Las llevo siempre en el corazón.

A Cecy y Óscar por su apoyo en mis experimentos y escritura de este trabajo, pero sobre todo, por ser mis amigos.

A todo el laboratorio 5 Phillip, Genaro, Gerardo y a todos los que crearon ese ambiente de trabajo tan agradable y por su apoyo incondicional cuando lo requerí.

A mis compañeros Pao, Kike, Pedro, Ana y Ale, por su amistad y hacer tan agradable este camino.

## **DEDICATORIA**

*A mis padres...*

## ÍNDICE GENERAL

	SECCIÓN	PÁGINA
	ÍNDICE DE TABLAS	<i>i</i>
	ÍNDICE DE FIGURAS	<i>ii</i>
	SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS	<i>iii</i>
	RESUMEN	<i>v</i>
	ABSTRACT	<i>vi</i>
<b>I</b>	INTRODUCCIÓN	1
<b>II</b>	ANTECEDENTES	3
	<b>II.I</b> CÁNCER	3
	<b>II.II</b> PREVALENCIA DEL CÁNCER PULMONAR	3
	<b>II.III</b> ETIOLOGÍA DEL CÁNCER	5
	<b>II.IV</b> ETAPAS DEL CÁNCER	
	<b>II.V</b>	6
	<b>II.VI</b> GEN WT1	7
	<b>II.VII</b> WT1 EN CÁNCER	9
	<b>II.VIII</b> WT1 Y EL PROCESO INFLAMATORIO	11
	<b>II.IX</b> INTERLEUCINA-10 EN CÁNCER	11
	<b>II.X</b> RELACIÓN DE WT1 E INTERLEUCINA 10 EN CÁNCER	12
<b>III</b>	JUSTIFICACIÓN	14
<b>IV</b>	HIPÓTESIS	15
<b>V</b>	OBJETIVO DEL TRABAJO	16
	<b>V.I</b> OBJETIVO GENERAL	16
	<b>V.II</b> OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
<b>VI</b>	MATERIAL Y METODOLOGÍA	17
	<b>VI.I</b> CULTIVO CELULAR	17
	<b>VI.II</b> TRATAMIENTOS	17
	<b>VI.III</b> ENSAYO DE MTT	18
	<b>VI.IV</b> INMUNOFLOURESCENCIA	18
	<b>VI.V</b> RETRO TRANSCRIPCIÓN – REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA	19
	<b>VI.V.I</b> EXTRACCIÓN DEL RNA	19
	<b>VI.V.II</b> DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN Y PUREZA DEL RNA	20
	<b>VI.V.III</b> SÍNTESIS DE cDNA	20
	<b>VI.V.IV</b> REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA	20
	<b>VI.V.V</b> ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA	22
	<b>VI.VI</b> TRANSFORMACIÓN DE <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$	22

	<b>VI.VI.I</b>	FORMACIÓN DE BACTERIAS CALCIO-COMPETENTES	22
	<b>VI.VI.II</b>	TRANSFORMACIÓN	22
	<b>VI.VI.III</b>	EXTRACCIÓN A PEQUEÑA ESCALA	23
	<b>VI.VI.IV</b>	CARACTERIZACIÓN DEL PLÁSMIDO RNAi-WT1	23
	<b>VI.VI.V</b>	PRODUCCIÓN A GRAN ESCALA	24
	<b>VI.VII</b>	TRANSFECCIÓN DE LA LÍNEA CELULAR A549 CON RNAi-WT1	25
	<b>VI.VII.I</b>	DETERMINACIÓN DE LD50 DEL RNAi-WT1 EN A549	25
	<b>VI.VII.II</b>	TRANSFECCIÓN	25
	<b>VI.VIII</b>	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	26
<b>VII</b>		RESULTADOS	27
	<b>VII.I</b>	LAS CITOCINAS DISMINUYEN LA VIABILIDAD DE LAS CÉLULAS A549	27
	<b>VII.II</b>	LAS CITOCINAS INCREMENTAN LA EXPRESIÓN DE TRANSCRITOS DE WT1 EN CÉLULAS A549	28
	<b>VII.III</b>	EL TNF- $\alpha$ Y LA IL-1 $\beta$ MODULAN LA EXPRESIÓN Y LOCALIZACIÓN DE WT1 EN CÉLULAS A549	29
	<b>VII.IV</b>	EL TNF- $\alpha$ Y LA IL-1 $\beta$ DISMINUYEN LA EXPRESIÓN DE LA IL-10 EN CÉLULAS A549	30
	<b>VII.V</b>	CARACTERIZACIÓN DEL PLÁSMIDO RNAi-WT1	32
	<b>VII.VI</b>	ENSAYO DE VIABILIDAD EN CÉLULAS A549 TRATADAS CON RNAi-WT1	33
<b>VIII</b>		DISCUSIÓN	35
<b>IX</b>		CONCLUSIONES	39
<b>X</b>		PERSPECTIVAS	40
<b>XI</b>		BIBLIOGRAFÍA	41
<b>XII</b>		RESUMEN BIOGRÁFICO	46



## ÍNDICE DE TABLAS

	<b>Página</b>
<b>Tabla 1</b> Concentraciones stock de los tratamientos utilizados.	17
<b>Tabla 2</b> Secuencias de oligonucleótidos empleados y su temperatura de alineamiento.	21
<b>Tabla 3</b> Localización de WT1 bajo el efecto de los tratamientos.	30

## ÍNDICE DE FIGURAS

		<b>Página</b>
<b>Figura 1</b>	Número de casos de pacientes con cáncer reportados en el 2018.	3
<b>Figura 2</b>	Número de defunciones por los diferentes tipos de cáncer.	4
<b>Figura 3</b>	Principales factores que inducen cáncer.	5
<b>Figura 4</b>	Diagrama representativo del cáncer <i>in situ</i> e invasivo.	6
<b>Figura 5</b>	Localización citogenética de <i>wt1</i> .	8
<b>Figura 6</b>	Organización del gen <i>wt1</i> .	9
<b>Figura 7</b>	Principales Antígenos Asociados a Tumor.	10
<b>Figura 8</b>	Esquema de amplificación de la reacción en cadena de la polimerasa.	21
<b>Figura 9</b>	Efecto del TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ y LPS en la Viabilidad de Células A549	27
<b>Figura 10</b>	Efecto del TNF- $\alpha$ y la IL-1 $\beta$ en los transcritos de WT1.	28
<b>Figura 11</b>	Modulación de la expresión y traslocación de WT1 luego de la exposición al TNF- $\alpha$ e IL-1 $\beta$ .	29
<b>Figura 12</b>	Expresión de WT1 por Inmunofluorescencia.	30
<b>Figura 13</b>	Efecto del TNF- $\alpha$ y la IL-1 $\beta$ en los transcritos de la IL-10.	31
<b>Figura 14</b>	Caracterización del plásmido RNAi-WT1.	32
<b>Figura 15</b>	Mapa del plásmido pGSH1-GFP.	33
<b>Figura 16</b>	Dosis letal del RNAi-WT1 en células A549.	34
<b>Figura 17</b>	Figura 17.- Esquema de regulación de la IL-10 por el TNF- $\alpha$ y la IL-1 $\beta$ vía WT1.	38

## SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

%	Por ciento
°C	Grados Celsius
µg	Microgramo
µL	Microlitro
A549	Línea celular de adenocarcinoma pulmonar humano
Ac	Anticuerpo
LD50	Concentración citotóxica media.
<i>cDNA</i>	DNA Complementario
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
DEPC	Dietilpiro carbonato
DMEM	Medio Eagle modificado de Dulbecco
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Nucleósido Trifosfato
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
g	Gramo
G3PDH	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
GC	Guanina-citocina
H <sub>2</sub> O	Agua
HR	Humedad relativa
IL-10	Interleucina-10
IL-1β	Interleucina-1β
IL-1βR	Receptor de interleucina-1β
TNF-α	Factor de necrosis tumoral-α
TNF-αR	Receptor del factor de necrosis tumoral-α
TGF-β	Factor de crecimiento tumoral-β
Kb	Kilobases
kDa	KiloDalton
KTS	Lisina-Treonina-Serina
LPS	Lipopolisacárido

mg	Miligramo
min	Minuto
mL	Mililitro
mM	Milimolar
mRNA	Ácido ribonucleico mensajero
MTT	Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio
NaCl	Cloruro de sodio
NF- $\kappa$ B	Factor nuclear – $\kappa$ B
ng	Nanogramo
nm	Nanómetro
O <sub>2</sub>	Oxígeno
PBS	Amortiguador fosfato salino
PCR	Reacción en cadena de polimerasa
pg	Picogramo
pH	Potencial de hidrógeno
PkA	Proteína cinasa A
PkC	Proteína cinasa C
RAW 264.7	Línea de macrófago murino transformado por el virus de Abelson
RNA	Ácido ribonucleico
rpm	Revoluciones por minuto
RT-PCR	Retro transcripción – Reacción en cadena de la polimerasa
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SFB	Suero fetal bovino
TAA	Antígeno asociado a tumor
TBS	Amortiguador tris salino
TBS-TW	Amortiguador tris salino - Tween
TEMED	Tetrametiletilendiamina
TLR-4	Receptor tipo toll-4
V	Volt
WB	Western blot
WT1	Tumor de Wilms 1

## RESUMEN

El cáncer pulmonar resalta entre las enfermedades que causan un mayor número de defunciones a nivel mundial y catalogándose en México como la primera causa de muerte por tumores malignos. Se ha asociado una alta expresión de WT1 con la prevalencia de un microambiente anti-inflamatorio en estadios avanzados, resaltando la presencia de la IL-10 y baja expresión de citocinas inflamatorias. Por ello el objetivo de esta investigación fue determinar si existe una regulación de la IL-10 con relación a WT1 y si citocinas inflamatorias como TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  pueden modular la expresión y localización de WT1.

Células A549 fueron tratadas con TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , el ensayo de RT-PCR permitió observar un incremento de transcritos de WT1, así como una disminución del mRNA de la IL-10. Se demostró una disminución de la proteína WT1 y su traslocación del núcleo al citoplasma por el ensayo de inmunofluorescencia además, por el ensayo de MTT se observó que los tratamientos con TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  comprometen la viabilidad de esta línea. De la misma manera, por el ensayo de MTT se determinó la dosis letal media de un RNAi-WT1 en las células A549, siendo de 0.27 $\mu$ g/mL.

Estos datos indican que las citocinas comprometen la viabilidad en células de adenocarcinoma pulmonar por la disminución de la expresión de la proteína WT1, además de la pérdida de su función de factor transcripcional al ser traslocada hacia el citoplasma. La dependencia de la línea A549 hacia WT1 para su viabilidad se comprobó mediante el silenciamiento con un RNAi-WT1, el efecto negativo de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  sobre WT1 se vio reflejado en la disminución de los transcritos de la IL-10, demostrando así su asociación en esta línea celular.

## ABSTRACT

Lung cancer stands out among the diseases that cause the highest number of deaths worldwide and is ranked in Mexico as the leading cause of death from malignant tumors. A high expression of WT1 has been associated with the prevalence of an anti-inflammatory microenvironment in advanced stages, highlighting the presence of IL-10 and low expression of inflammatory cytokines. Therefore, the aim of this research was to determine if there is a regulation of IL-10 in relation to WT1 and if inflammatory cytokines such as TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  can modulate the expression and location of WT1.

A549 cells were treated with TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$ , the RT-PCR assay showed an increase in WT1 transcripts, as well as a decrease in IL-10 mRNA. A decrease of the WT1 protein and its translocation from the nucleus to the cytoplasm was demonstrated by the immunofluorescence assay and by the MTT assay, it was observed that the treatments with TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  compromise the viability of this cell line. In the same way, the LD50 of an RNAi-WT1 in A549 cells was determined by the MTT assay, being 0.27 $\mu$ g / mL.

These data indicate that cytokines compromise viability in lung adenocarcinoma cells due to decreased expression of the WT1 protein, in addition to the loss of its transcription factor function when translocated to the cytoplasm. The dependence of the A549 line towards WT1 for its viability was verified by silencing with an RNAi-WT1, the negative effect of TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  on WT1 was reflected in the decrease of IL-10 transcripts, thus demonstrating their association in this cell line.

## I. INTRODUCCIÓN

El cáncer se ha definido como el conjunto de enfermedades que presenta una proliferación y diseminación de células anormales en un organismo, se sabe que puede ser causado por diversos factores entre los que resalta el tabaquismo, radiaciones, mutaciones heredables, problemas inmunológicos, agentes infecciosos, entre otros.

En respuesta a este tipo de enfermedades, el sistema inmune desencadena la liberación de moléculas pro-inflamatorias como lo es el TNF- $\alpha$  y la IL-1 $\beta$  entre muchas otras, con el objetivo de atacar y destruir a estas células anormales. No obstante, una vez reclutadas células como macrófagos y neutrófilos, estos pueden llegar a perder su capacidad de reconocimiento y eliminación de la célula cancerosa mediante la polarización de M1 y N1 a M2 y N2 de macrófagos y neutrófilos, respectivamente.

Dichos cambios favorecen la evasión del sistema inmune e inducen el proceso de angiogénesis para poder llevar a cabo la metástasis. Se sabe que durante todo este proceso ocurren cambios en el perfil de expresión de citocinas tanto pro-inflamatorias como anti-inflamatorias, esto depende de la fase en la que se encuentre el desarrollo del cáncer que inducirá la producción de estas citocinas por parte de células del sistema inmune.

Con base en esto, el tratamiento de estas enfermedades involucra tanto la quimioterapia como el uso de inmunomoduladores. Las terapias suelen estar dirigidas contra los Antígenos Asociados a Tumor (TAA por sus siglas en inglés) que son marcadores que se expresan en diferentes tipos de cáncer, de entre todos estos, se ha catalogado a la Proteína del Tumor de Wilms (WT1) como el TAA número 1 por su presencia en la mayoría de estas células anormales, incluyendo al cáncer pulmonar.

Se han desarrollado diversas terapias contra WT1, entre las que destacan la vacunación con péptidos sintéticos y el uso de RNAi para la reducción y erradicación del tumor en algunos casos. A pesar de que se ha descrito la capacidad de WT1 como factor transcripcional involucrado en la regulación de genes pro-supervivencia y proliferación, aún se desconoce el papel que juega esta proteína en la modulación de la respuesta del sistema inmune.

Por lo que en este trabajo se pretende evaluar si existe una correlación entre la expresión de WT1 mediante la exposición a citocinas inflamatorias y si existen cambios en el perfil de la citocina anti-inflamatoria IL-10, tomando como base el hecho de la presencia de un elemento de respuesta a WT1 en promotor del gen de esta citocina. De manera que se podrá determinar si este TAA además de ser importante en la inducción de la proliferación, también presenta un rol en la modificación de la respuesta inmune que favorece las condiciones en el microambiente tumoral para el desarrollo del cáncer al inducir la expresión de la citocina anti-inflamatoria IL-10.



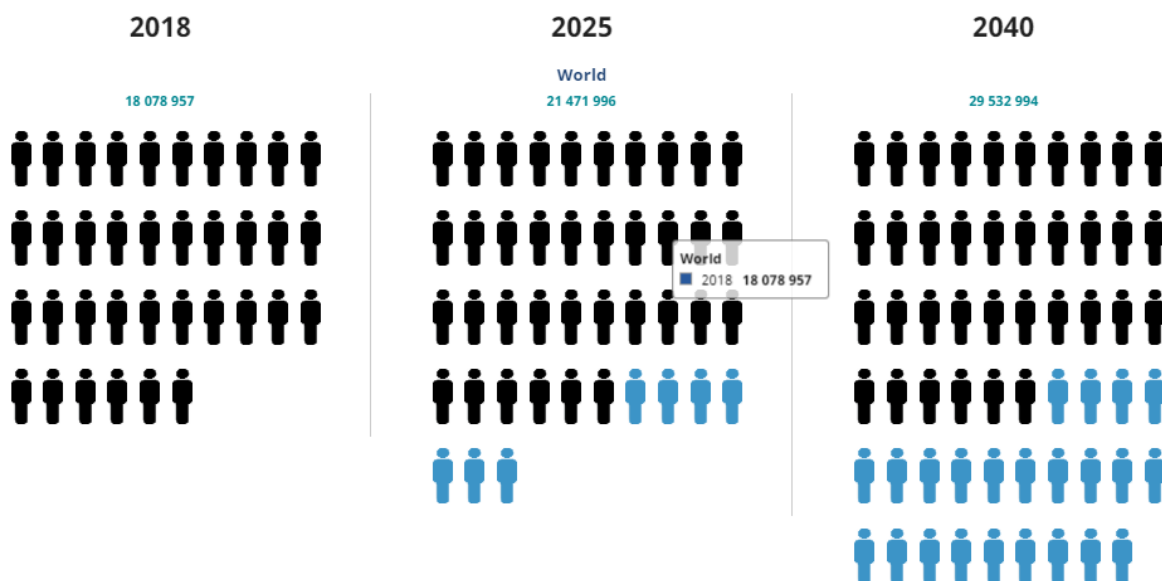
## II. ANTECEDENTES

### II.I. CÁNCER

Denominado como el conjunto de enfermedades con la característica del crecimiento descontrolado de células con propiedades anormales y su diseminación hacia otros tejidos, el cáncer es considerado como una enfermedad potencial para la salud pública por el hecho en que su presencia en la población ha ido en aumento en los últimos años (Roncali, 2010).

La Organización Mundial de la Salud reportó en septiembre del 2018 la presencia de 18.1 millones de casos nuevos y 9.6 millones de defunciones en el mismo año, estableciendo que 1 de cada 5 hombres y 1 de cada 6 mujeres desarrollan el cáncer durante su vida mientras que 1 de cada 8 hombres y 1 de cada 11 mujeres mueren por estos padecimientos. En cuanto a la prevalencia, se estima que el total de personas que viven con cáncer en los últimos 5 años ha alcanzado la cifra de 43.8 millones de afectados. Tan solo en América se ha reportado una incidencia del 21% y una mortalidad del 14.4% respecto a los valores globales (Organización Mundial de la Salud, 2020).

Además, se estima que para el 2025 el número de personas afectadas con cáncer pase de 18 millones a aproximadamente 21.5 millones (Figura 1).

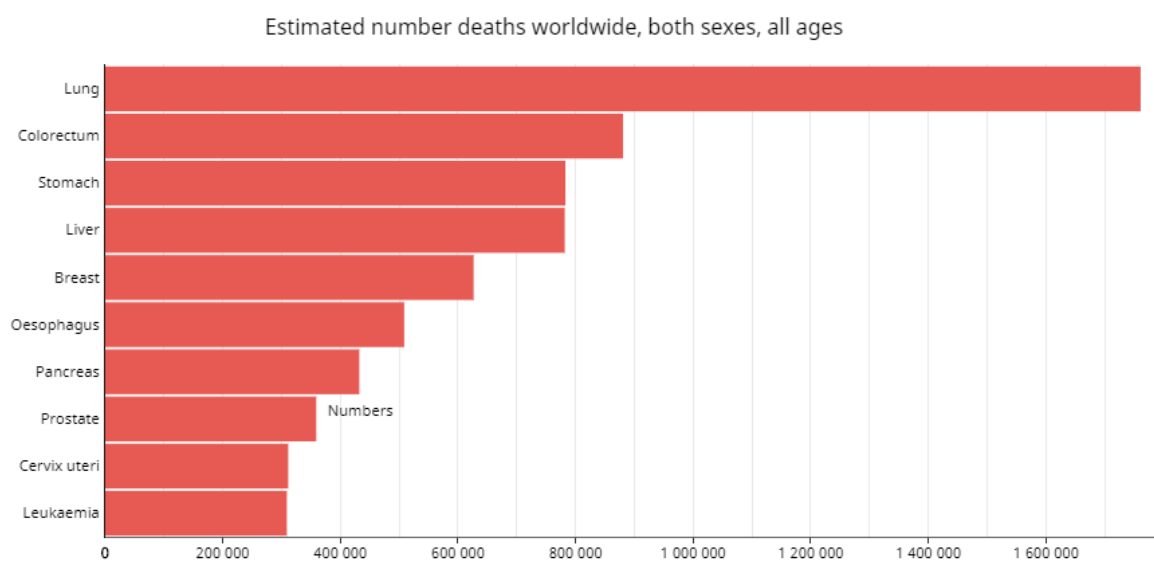


**Figura 1.- Número de casos de pacientes con cáncer reportados en el 2018 y su estimación al año 2025 y al 2040 de acuerdo a la Organización Mundial de la Salud.**

## II.II. PREVALENCIA DEL CÁNCER PULMONAR

Se han descrito muchos tipos de cáncer que afectan a la población, la Organización Mundial de la Salud ha reportado que el cáncer pulmonar, de mama y colorectal se catalogan en el top 3 en cuanto a incidencia a nivel mundial, referente a la mortalidad se ha ranqueado al cáncer pulmonar como el número 1 en defunciones, seguido del colorectal y de mama ubicado en quinta posición. En conjunto, solo estos 3 tipos de cáncer cubren la tercera parte en cuanto a incidencias y mortalidad del total de cáncer en la población mundial (Organización Mundial de la Salud, 2020).

Para resaltar aún más la presencia del cáncer de pulmón, la Organización Mundial de la Salud ha reportado que aproximadamente se reportaron 2.1 millones de casos nuevos tan solo en el 2018, además, es el responsable del mayor número de defunciones al alcanzar una cifra de 1.8 millones y cubriendo el 18.4% del total de muertes por cáncer (Figura 2).



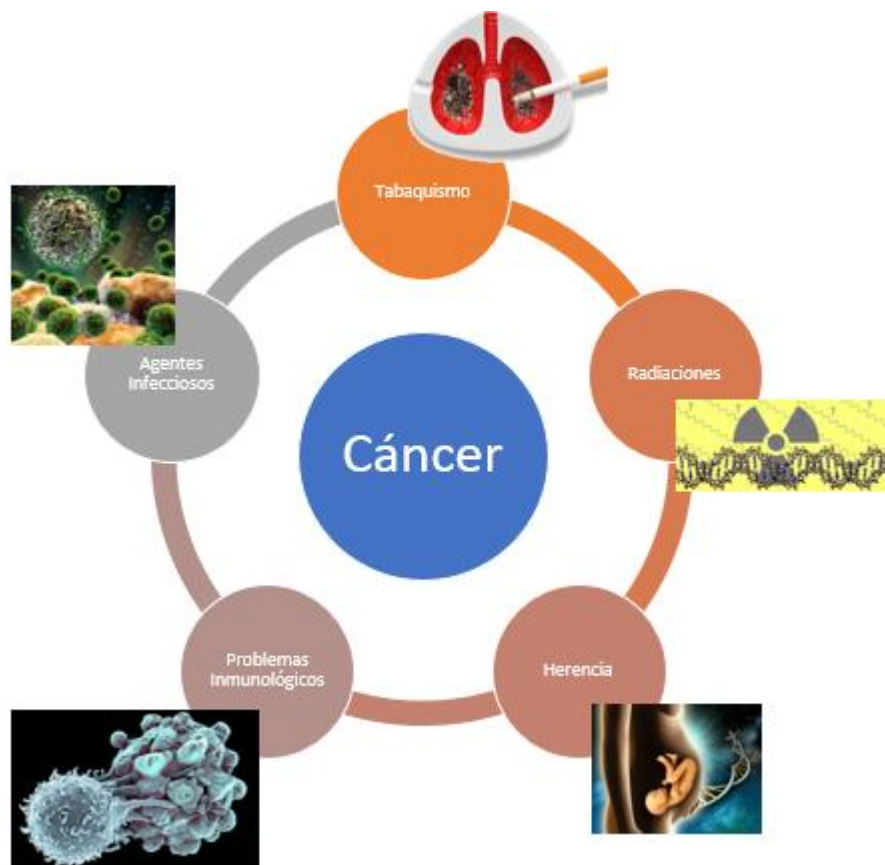
**Figura 2.- Número de defunciones por los diferentes tipos de cáncer**, el cáncer pulmonar es significativamente la causa principal de muerte entre estas enfermedades a nivel mundial, cubriendo el 18.4% del total de muertes por este tipo de patologías.

En cuanto a su asociación con el sexo, el cáncer pulmonar se ha detectado principalmente en hombres con un 14.5% del total de los casos, aunque en mujeres alcanza el 8.4%. En cuanto a la mortalidad, en hombres representa el 22% (1 de cada 5 tipos de cáncer), seguido del de próstata (13.5%), colorectal (10.9%), hígado (10.2%) y estómago (9.5%). Esta alta incidencia se ha reportado principalmente en Norte América, Norte y Oeste de

Europa, China, Australia, Nueva Zelanda y Hungría (Organización Mundial de la Salud, 2020).

### II.III. ETIOLOGÍA DEL CÁNCER

En los últimos años se ha definido que el cáncer no presenta una única causa, por el contrario, se sabe que es de origen multifactorial donde participan como responsables factores tanto ambientales como intrínsecos del organismo. De manera general se han catalogado como factores externos e internos, donde los primeros hacen referencia a la influencia de microorganismos infecciosos, mala nutrición, exposición a agentes químicos, radiación y por supuesto, el tabaquismo. En los factores internos participan los factores hormonales, mutaciones heredables, condiciones inmunológicas, etc. (Figura 3) (National Cancer Institute, 2020).



**Figura 3.- Principales factores que inducen cáncer,** destacando el tabaquismo, radiaciones, factores genéticos ligados a la herencia, problemas inmunológicos y agentes infecciosos.

## II.IV. ETAPAS DEL CÁNCER

En la célula existen genes encargados de la regulación de procesos como la diferenciación celular y la proliferación, a estos se les denomina también como proto-oncogenes. Mutaciones en estos pueden generar la activación de oncogenes, codificando a proteínas desencadenadoras de cascadas de señalización que repercuten en la estimulación de la proliferación celular (Herráez, 2012).

Estas modificaciones en los patrones de expresión dan lugar a la generación de células anormales, o bien, cancerosas. Estas presentan un incremento en la secreción de factores de crecimiento, aumento en la producción de oncogenes y la disminución o pérdida de la expresión de los supresores tumorales, dando así origen a la neoplasia (Croce, 2008).

Las neoplasias se pueden clasificar dependiendo del grado de invasión que presenten, siendo in situ o invasivo, en el primero el tumor se encuentra de manera localizada sin presentar características invasivas, se asocia comúnmente a etapas tempranas de la patología (Zhuang, 1995). En el invasivo se encuentra creciendo en todas las direcciones y se asocia a etapas tardías de la enfermedad, pudiendo infiltrar e invadir otros órganos del individuo afectado, logrando así diseminarse (Figura 4).

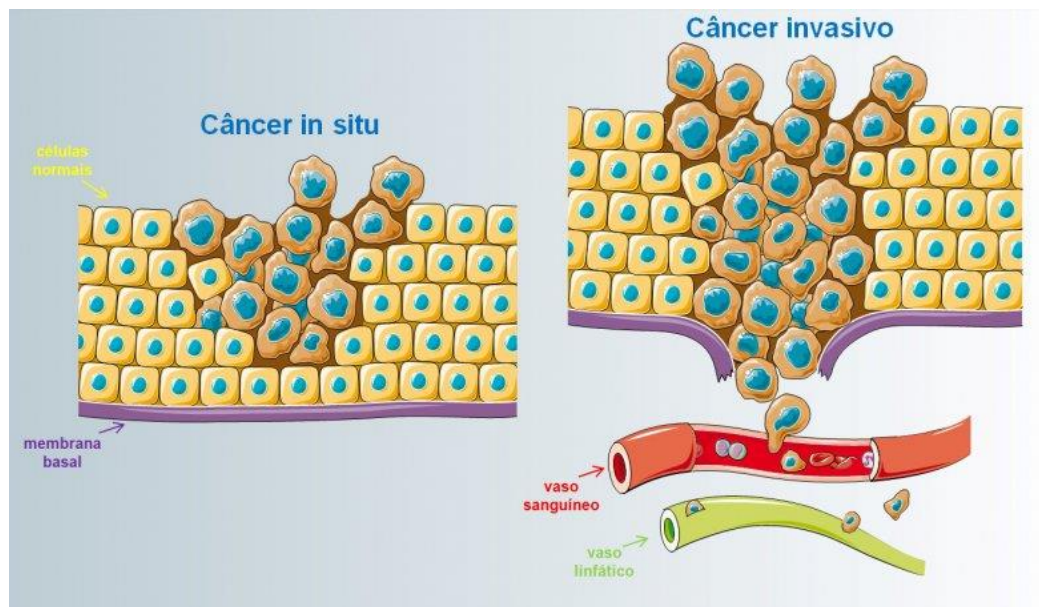


Figura 4.- Diagrama representativo del cáncer in situ (Izquierda) e invasivo (Derecha).

Para definir los estadios se considera el tamaño tumoral y la extensión o diseminación en el organismo. La importancia de la clasificación radica en brindar información al médico para poder llevar a cabo un tratamiento para el control de la enfermedad (Zhuang, 1995).

El Comité Americano Conjunto contra el Cáncer (AJCC por sus siglas en inglés) ha desarrollado la clasificación TNM para definir el estadio del cáncer en cuestión, donde las letras hacen referencia al Tamaño del tumor (T seguida de un número del I al IV), a la cuantificación de ganglios linfáticos al tumor primario que se encuentran con células anormales (N seguida de un número del 0 al 3) y a la Metástasis que pudiese presentar en caso que ya haya invadido otros tejidos (Letra M seguida por un 0 ó 1 dependiendo si no ha invadido o si ya lo ha hecho).

Dicho proceso de metástasis es el punto crítico para el paciente, se caracteriza por la formación de un foco tumoral en un sitio distinto a donde ya ha ocurrido la aparición del tumor primario, esta migración ocurre por la vía sanguínea o linfática y aproximadamente el 98% de las muertes son atribuidas al proceso de metástasis por una deficiencia en la detección de esta o del tumor en si en etapas tempranas (Gupta, 1996).

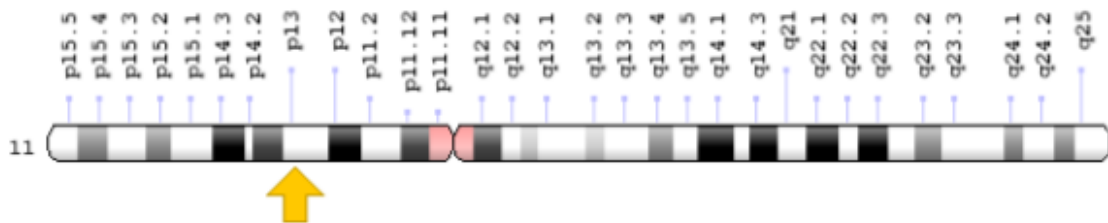
Esta capacidad de migración hacia otros tejidos se da por el escape a las vías sanguíneas o linfáticas, proceso que se ve favorecido por la presencia de células del sistema inmune que mediante un proceso inflamatorio llegan al sitio y comienza la secreción de moléculas estimulantes de la angiogénesis que estimularán a las células endoteliales vasculares y la producción de metaloproteasas (Carmeliet, 2000).

## **II.V. GEN WT1**

WT1 es un producto del gen de tumor de Wilms, denominado también como un factor transcripcional maestro, se han descrito diversas funciones dependiendo del tejido en el que se esté expresando. En un principio fue caracterizado en individuos afectados por el tumor de Wilms o nefroblastoma y fue originariamente definido como un gen supresor tumoral al encontrarse mutado en un 15% de los tumores de Wilms (del Valle, 2016), no obstante, en la actualidad se encuentra más bien descrito como un potencial oncogen,

capaz de inducir la proliferación de células neoplásicas al ser un factor transcripcional de genes relacionados con ese proceso.

Desde el punto de vista genético, el gen codificante a WT1 se ubica en el cromosoma 11 brazo pequeño 13, formado por aproximadamente 50Kb comprende 10 exones que producen un mRNA de 3kb (Figura 5). Dicho mRNA presenta tres sitios de inicio de la traducción, que dan paso a la formación de tres isoformas de distinto peso molecular, siendo de 52-54kDa, 62-64 kDa y 36- 38 kDa, siendo la primera la que se expresa más frecuentemente (Genomebrowser, 2020).

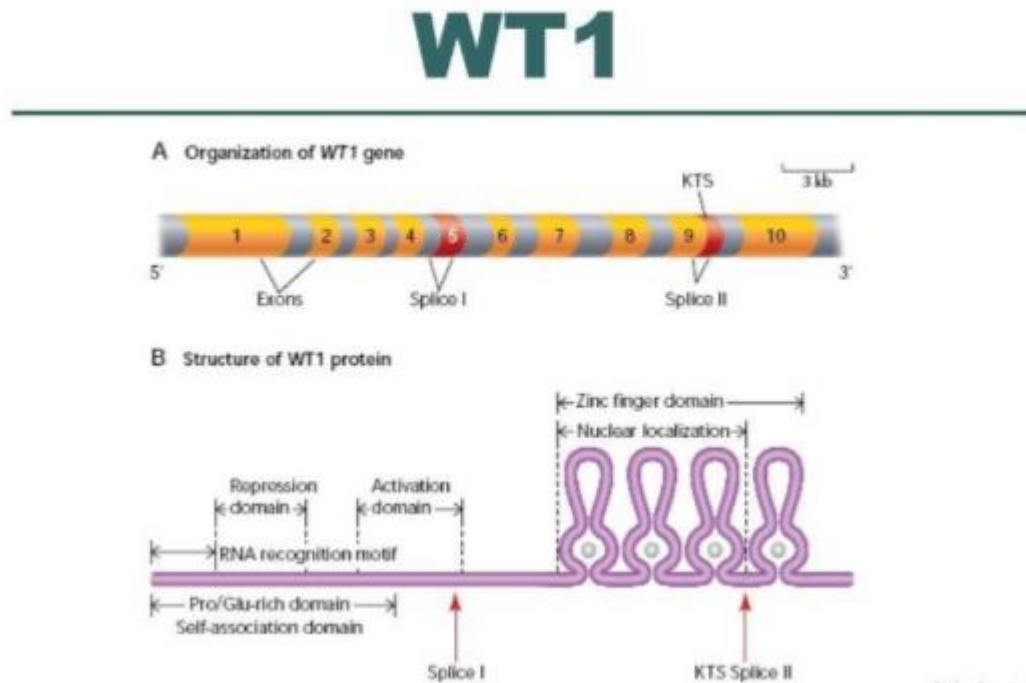


**Figura 5.- Localización citogenética de *wt1*, 11p13:** Brazo corto del cromosoma 11 en la posición 13, comprende de 32,387,435,539pb en Homo sapiens (Anotación de Homo sapiens 109, GRCh38.p12, NCBI).

No obstante, en consecuencias de modificaciones postranscripcionales hacia el mRNA, WT1 puede llegar a tener más de 36 isoformas, de entre las que destacan dos eventos de splicing: Uno en el exón 5 y otro en el exón 9. En el exón 5 ocurre una delección de 17 aa (aminoácidos), en el exón 9 dicha delección es de 3 aa : Lisina, treonina y serina. Siendo las variantes +/- 17aa y +/-KTS. De esta manera se logran obtener cuatro isoformas principales de la proteína:

- A. WT1+/+: Positivo para 17aa y para los KTS.
- B. WT1+/-: Positivo para 17aa pero sin los aminoácidos KTS-
- C. WT1-/+ : Sin los 17aa pero con los KTS.
- D. WT1-/-: Negativo para los 17aa y KTS.

El punto crítico va por la variante KTS + o -, ya que se encuentra en el exón 9. El dominio C- Terminal de WT1 presenta un dominio con unión al DNA formado por 4 dedos de zinc, este interactúa con secuencias ricas en GC y participa en la expresión de una gran cantidad de genes, además, WT1 también tiene la capacidad de interactuar con otras proteínas y con RNA. Para que la interacción con el DNA se logre o no, interviene la variante KTS, pues la inserción o ausencia de estos ocasionan un rearrreglo tridimensional en los dedos de zinc que interviene con la afinidad de WT1 hacia el DNA, impidiendo o permitiendo la unión al DNA (Li, 1997) (Figura 6).



**Figura 6.- A) Organización del gen *wt1***, compuesto por 10 exones y cubriendo más de 32kb. B) En cuanto a la estructura, al dominio C-Terminal se pueden visualizar los dedos de zinc que este adopta, brindando así su función como factor transcripcional. Hacia el lado N-Terminal se observan los dominios activadores o represores, así como los dominios ricos en Pro y Glu, para interacciones con otras proteínas (Scholz & Kirschner, 2005).

## II.VI. WT1 EN CÁNCER

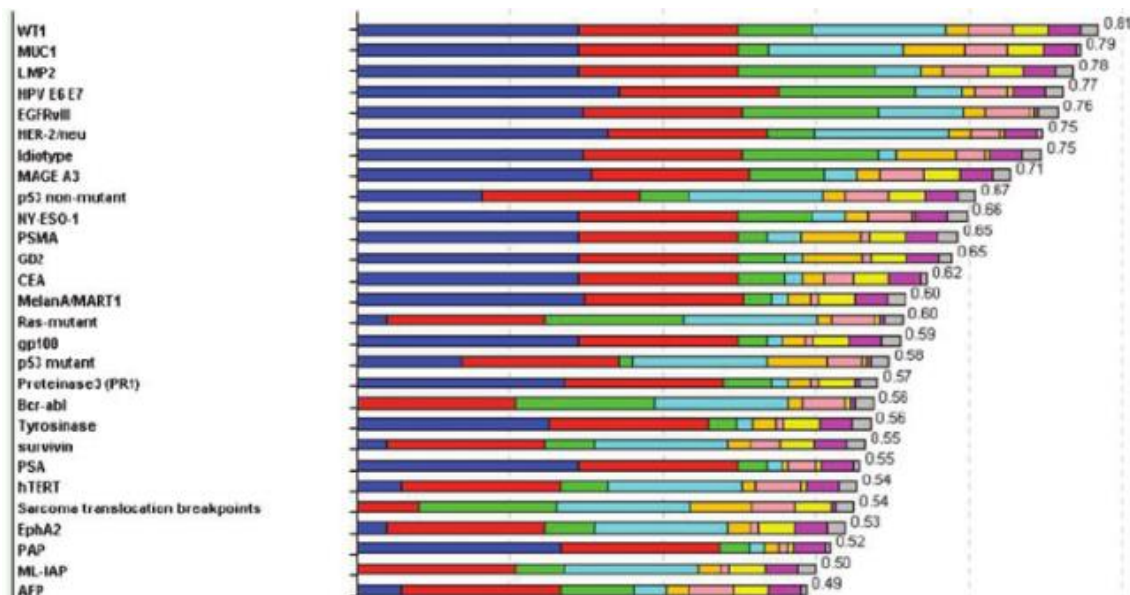
El gen codificante a WT1 fue caracterizado inicialmente como un supresor tumoral, ya que se encontraba en su forma inactiva en niños con predisposición genética a desarrollar nefroblastomas o bien, Tumores de Wilms (Higinbotham, 1998).



Por otro lado, estudios recientes en leucemias, cáncer pulmonar, sarcoma de hueso, carcinoma de células escamosas en cabeza y cuello, además de cáncer de mama entre otros, han demostrado la importancia de WT1 en la supervivencia celular, la diferenciación y proliferación. Tomando en cuenta que dichos tejidos no expresan normalmente a WT1, se sugirió que su papel puede ser de oncogen en dichos tejidos (Oji, 2003).

Fue hasta la fecha del 2000 cuando el término de Antígeno Asociado a Tumor (TAA por sus siglas en inglés) y WT1 comenzaron a tener asociación. Específicamente mediante la identificación de la alta expresión del gen en leucemia linfática aguda y en el síndrome mielodisplásico descrito por Oka y sus colaboradores en el año 2000 (Oka y col. 2000).

De hecho, el National Cancer Institute ha catalogado a WT1 como el TAA número 1 desde el año 2009 (Figura 7), aún por encima de otros marcadores como lo son HER-2, EGFR, p53, Ras mutante, entre otros de los principales. El estudio se basó en el análisis de la función terapéutica (Azul), inmunogenicidad (Rojo), especificidad (Verde), oncogenicidad (Celeste), Nivel de expresión en células positivas (Naranja), Expresión en células madre (Rosa), Número de pacientes con cáncer positivo a antígeno (Amarillo), Número de epítopes (Morado) y la localización celular de la expresión (Gris).



**Figura 7.- Principales Antígenos Asociados a Tumor**, se puede observar la presencia de WT1 como número 1.



Con base en estos descubrimientos se han desarrollado una serie de terapias dirigidas contra WT1, entre las que han tenido mejores resultados destaca el RNA de interferencia que bloquea la traducción del mensajero a proteína mediante una degradación por complementariedad y mediante el estudio de la respuesta humoral contra WT1, encontrando que el cuerpo por sí mismo es capaz de montar una respuesta mediante la generación de anticuerpos, no obstante, esta respuesta no fue suficiente para erradicar el cáncer (Elisseeva, 2002).

## **II.VII. WT1 Y EL PROCESO INFLAMATORIO**

Resientes investigaciones han demostrado la capacidad de las citocinas inflamatorias para ejercer modificaciones en los patrones de localización de WT1, afectando así, su actividad transcripcional. Arellano (2019) demostró mediante la inducción de un proceso inflamatorio con lipopolisacárido en un modelo murino que existen modificaciones postraduccionales que intervienen en la traslocación nuclear-citoplasmática de WT1. Aunque el estudio fue realizado a nivel renal, específicamente en podocitos, es posible que esta traslocalización sea extrapolable a lo que ocurre en cáncer.

Se ha determinado que la principal modificación postraducciona que ejerce los cambios en la localización de WT1 es la fosforilación, esta es ejercida por las proteínas quinasas PKA y PKC principalmente, estas en respuesta a un estímulo inducido por el LPS y algunas citocinas de carácter inflamatorio, entre ellas TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ . Dicho estímulo se logra al interactuar el LPS con el receptor de tipo Toll TLR-4 o bien, de las citocinas descritas previamente con sus respectivos receptores TNF- $\alpha$ R e IL-1 $\beta$ R. Al interaccionar estos receptores con sus respectivos ligandos, se desencadenará una cascada de señalización que inducirá la activación de NF- $\kappa$ B y a su vez, PKA y PKC (Ye, 1996).

## **II.VIII. INTERLEUCINA 10 EN CÁNCER**

La interleucina 10 es una de las principales citocinas anti-inflamatorias que se han visto involucradas en un mal pronóstico en cuanto al desarrollo del cáncer y respecto a la recuperación del paciente afectado, hablando del cáncer pulmonar, se ha visto que en

etapas tempranas hay un incremento de citocinas inflamatorias que favorecen la expresión de WT1, además, este perfil inflamatorio favorece el reclutamiento de células del sistema inmune como macrófagos y neutrófilos que participarán en el proceso de angiogénesis tumoral luego de su polarización de M1 y N1, respectivamente a M2 y N2 (Bogdan, 1991).

Sciesielski y sus colaboradores demostraron que WT1 regula a la alta la expresión de IL-10 (Sciesielski y col. 2010), por lo que posterior a esto, se inducirá un cambio del perfil inflamatorio a uno anti-inflamatorio, favoreciendo así la evasión del sistema inmune.

Estudios han catalogado a esta interleucina como blanco, reportando que en etapas tempranas puede ser administrada por inhalación para evitar el perfil inflamatorio y por ende la angiogénesis en cáncer pulmonar (Qingsheng y col. 2018). Por el lado contrario, también se ha demostrado que su producción por parte de macrófagos M2 promueve el cáncer pulmonar por la vía JAK1/STAT1/NF- $\kappa$ B/Notch1 (Yang y col. 2019), posiblemente este proceso tiene lugar en las etapas tardías del cáncer, donde el microambiente favorable para el tumor es el del perfil anti-inflamatorio.

Lo anterior ha sido apoyado por Wang y sus colaboradores al establecer una correlación del incremento de la IL-10 en etapas tardías del cáncer pulmonar (Wang y col. 2011). Dicho incremento podría estar suprimiendo la actividad de las células T y APC al establecer un microambiente poco favorable para el reconocimiento tumoral y la respuesta citotóxica (Sharma y col. 2019) y por ende, regulando la tolerancia del tumor en el cáncer pulmonar (Vahl y col. 2017).

## **II.IX. RELACIÓN DE WT1 E INTERLEUCINA 10 EN CÁNCER**

WT1 ha sido catalogado como blanco al ser considerado el mejor antígeno asociado a tumor, en respuesta a esto se han implementado inmunoterapias basadas en péptidos contra WT1 en pacientes con cáncer pulmonar y demostrando la regresión parcial de la enfermedad (Tsuboi y col. 2003). No obstante, las terapias han sido empleadas tomando como fundamento la relación de WT1 con los genes involucrados en la proliferación celular y apoptosis.

Tomando como referencia la interacción de WT1 con el promotor de la Interleucina 10 y la activación de su expresión, en este trabajo se pretende elucidar si WT1 efectivamente juega un papel en la inmunosupresión durante el desarrollo del cáncer pulmonar.

### **III. JUSTIFICACIÓN**

El cáncer continúa siendo una problemática hacia la salud pública por el creciente número de incidencias y mortalidad a nivel mundial, particularmente, el cáncer pulmonar se posiciona en primer lugar de acuerdo con la Organización Mundial de la Salud. En etapas avanzadas, el cáncer pulmonar se caracteriza por presentar una baja expresión de citocinas inflamatorias y con una alta expresión de WT1 en un microambiente anti-inflamatorio. Por esto es necesario saber si existe relación entre la expresión de WT1 y la expresión de la Interleucina-10 (Una de las principales citocinas anti-inflamatorias) en cáncer pulmonar y si esta regulación puede ser modulada por citocinas inflamatorias como el TNF- $\alpha$  y la IL-1 $\beta$ .

#### **IV. HIPÓTESIS**

Las citocinas TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  regulan negativamente a la IL-10 a través de WT1 en células A549.

## **V. OBJETIVO DEL TRABAJO**

### **V.I. Objetivo general:**

- Determinar el efecto de las citocinas TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  en la expresión y localización de WT1 y su efecto sobre IL-10.

### **V.II. Objetivos específicos:**

- Evaluar el efecto de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  en la expresión y localización de WT1 en células de cáncer pulmonar A549.
- Determinar la correlación entre WT1 e IL-10 en células A549 tratadas con TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ .

## **VI. MATERIAL Y MÉTODOS**

### **VI.I. Cultivo Celular**

La línea celular A549 fue obtenida del banco de células del Laboratorio de Inmunología y Virología de la Facultad de Ciencias Biológicas. Fue cultivada en una caja de 25 centímetros cuadrados (cm<sup>2</sup>) con medio DMEM suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) y 1% de antibiótico antimicótico (aa). El cultivo fue colocado en una incubadora a 37 grados centígrados (°C), una humedad relativa (HR) del 70% y una inyección de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) del 5%, el cultivo fue monitoreado diariamente hasta alcanzar la estabilidad de la línea.

### **VI.II. Tratamientos**

Se utilizó como control negativo el medio de cultivo y como control positivo la exposición al lipopolisacárido (LPS), en la tabla 1 se muestra la concentración del stock de IL-1  $\beta$ , TNF- $\alpha$  y del LPS empleadas.

Tabla 1.- Concentraciones stock de los tratamientos utilizados.

<b>Tratamiento</b>	<b>Concentración Stock</b>
IL-1 $\beta$	1 ng/ $\mu$ L
TNF- $\alpha$	1 ng/ $\mu$ L
LPS	400 ng/mL

Los ensayos en la línea celular A549 se realizaron en placas de 6 pozos a los siguientes tiempos:

1. IL-1 $\beta$  a 6, 12 y 24 h.
2. TNF $\alpha$ - a 6, 12 y 24 h.
3. LPS a 6, 12 y 24 h.
4. Control negativo (Medio DMEM, SFB 10% y Antibiótico/antimicótico 1%) a 6, 12 y 24 horas.

Las concentraciones de los tratamientos fueron las siguientes:

1. IL-1 $\beta$ : 20ng/mL, añadiendo 60  $\mu$ L del stock de IL-1 $\beta$  a 2,940  $\mu$ L de medio DMEM suplementado con 10% de SFB y 1% de aa.
2. TNF- $\alpha$ : 10ng/mL, añadiendo 30  $\mu$ L del stock de TNF- $\alpha$  a 2,970  $\mu$ L de medio DMEM suplementado con 10% de SFB y 1% de aa.
3. LPS: 100ng/mL, añadiendo 750  $\mu$ L del stock de LPS a 2,250  $\mu$ L de medio DMEM suplementado con 10% de SFB y 1% de aa.
4. Control Negativo: Las células para el control negativo fueron colocadas con 3 mL de medio DMEM suplementado con 10% de SFB y 1% de antibiótico/antimicótico.

Las células fueron colectadas para su posterior extracción de proteínas y de RNA, la colecta se realizó por disgregación celular con tripsina-EDTA y se transfirió el contenido a tubos de microcentrífuga de 1.5mL destinando la mitad para la extracción de proteínas y la otra mitad para la extracción del RNA.

### **VI.III. Ensayo de MTT**

Se plaquearon 5,000 células en placas de 96 pozos para la línea celular A549, los tratamientos a evaluar fueron los descritos previamente y se realizó un ensayo de MTT para determinar el efecto en la viabilidad celular. Se preparó una solución de MTT a 5mg/mL en buffer PBS estéril y se añadieron 20  $\mu$ L a cada pozo, se incubó durante 90 min a 37°C y se decantó el sobrenadante. Finalmente, las sales fueron precipitadas añadiendo 100  $\mu$ L de DMSO y se prosiguió a realizar la lectura en un lector de placa de ELISA a una longitud de onda de 570nm.

### **VI. IV. Inmunofluorescencia**

Se plaquearon 200,000 células A549 en una placa de 6 pozos y se incubaron a las condiciones descritas previamente durante 24 horas. Después se aplicaron los tratamientos descritos anteriormente durante 6 horas.



Posterior posteriormente se permeabilizo las membranas con solución Tris-buffer salino (TBS) + Tween 20 (1%) por 3 min. Para la exposición de antígenos se introdujeron las laminillas en TRS y se llevaron a una olla de vapor durante 10 min (100°C) y se dejó reposar durante otros 10 min.

Se aplicó en anticuerpo primario F6 (1:50) de WT1 de Santa Cruz Biotechnology toda la noche a 4°C, seguido de un lavado por 3 min con TBST y la aplicación del anticuerpo secundario anti-Ratón conjugado con Rojo Texas (1:200) por 1.5 h. Se lavó y se contrasto con DAPI por 30 min, se montó con PBS/Glicerol (3:7). Las muestras fueron observadas en un microscopio confocal (Olympus BX61W1) con un objetivo de agua 60X utilizando un láser de 405 para DAPI y 559 nm para Rojo Texas. Las imágenes fueron procesadas utilizando el programa ImageJ.

## **VI. V. Retro Transcripción - Reacción en Cadena de la Polimerasa (RT-PCR)**

### **VI. V. I. Extracción del RNA**

La extracción se llevó a cabo por el método del Trizol, Para esto se homogenizaron las células añadiendo 1mL de Trizol y se dejó incubar durante 5 min a temperatura ambiente para permitir la lisis. Posterior a esto, se agregaron 200 µL de cloroformo y se homogenizó vigorosamente la solución durante 15 s, se dejó en incubación a temperatura ambiente durante 3 min, finalmente se centrifugó a 12,000 gravedades por 5 min a 4 °C.

Después de centrifugar la muestra se tomó la fase acuosa y se precipitó en un tubo Eppendorf con 500µl de isopropanol, se dejó incubar a temperatura ambiente por 10 min, enseguida se centrifugó a 12,000 gravedades por 10 min a 4 °C. Después se lavó el pellet con 1mL de etanol al 75%, se homogenizó y se centrifugó a 7,500 gravedades por 5 min a 4°C, por último, se dejó secar de 5 a 10 min y se resuspendió en 50 µL de agua libre de RNAsas. Las muestras se incubaron a 55 °C de 10 a 15 min para posteriormente realizar la lectura de su concentración y pureza empleando el NanoDrop.

## **VI. V. II. Determinación de la concentración y pureza del RNA**

Se determinó la concentración y pureza del RNA de los tratamientos y del control para cada uno de los tiempos 6, 12 y 24 horas. Con ayuda del NanoDrop proporcionado por la Unidad de Virología del LIV, colocando 1  $\mu\text{L}$  de cada muestra se realizaron lecturas a 260nm y a 280nm, una vez obtenidas las absorbancias, el equipo calculará la concentración de cada muestra y se registraron los resultados emitidos.

## **VI. V. III. Síntesis de cDNA**

Para cada reacción se adicionó en un tubo Eppendorf un volumen determinado que contenía 5 $\mu\text{g}$  de RNA, el volumen dependía de la concentración del RNA obtenido previamente, se añadió el restante correspondiente de  $\text{H}_2\text{O}$  libre de RNAsa y tratada con dietilpirocarbonato (DEPC) para la obtención de los 5 $\mu\text{g}$  resuspendidos en un volumen total de 10  $\mu\text{L}$ , a estos 10  $\mu\text{L}$  se les añadió 2  $\mu\text{L}$  de 10X TR Buffer, 0.8  $\mu\text{L}$  de 25X dNTP MIX, 2  $\mu\text{L}$  de 10X RT Random Primers, 1  $\mu\text{L}$  de Multiscribe <sup>TM</sup> Reverse Transcriptase y 4.2  $\mu\text{L}$  de agua libre de RNAsa para cada tratamiento. La reacción se llevó a cabo en un termociclador proporcionado por la UBMC del LIV con las siguientes condiciones de reacción:

1. 1 minuto a 25 °C.
2. 120 minutos a 37 °C.
3. 5 minutos a 85 °C.

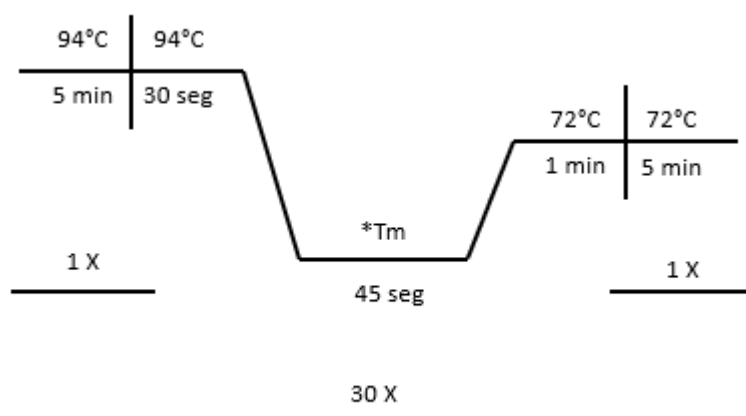
Los tubos con el cDNA fueron almacenados a 4 °C para su posterior análisis.

## **VI. V. IV. Reacción en Cadena de la Polimerasa**

Se realizó la amplificación del gen *wtI* y de la IL-10, amplificando también como control endógeno G3PDH. La reacción se realizó con 5  $\mu\text{L}$  de cada cDNA, 5  $\mu\text{L}$  de 5X My Taq Reaction, 0.5  $\mu\text{L}$  de Primers Forward y Reverse, 0.5  $\mu\text{L}$  My Taq DNA Polimerase y un volumen de agua libre de DNAsa para suficiente para obtener un total de 25  $\mu\text{L}$ .

Para determinar las condiciones de alineamiento de los primers a utilizar, se calculó mediante el programa online de oligoanalyzer y así se obtuvieron las condiciones de reacción óptimas para dicho alineamiento y otras características como la formación tanto de homodímeros como de heterodímeros.

La reacción consistió en una desnaturalización inicial de 5 min a 94°C, seguida de 35 ciclos de desnaturalización (94°C durante 30 segundos), alineamiento (Tabla 2) y síntesis (72°C durante 1 min), finalmente se realizó una fase de síntesis final de 5 min a 72°C. El esquema del programa de amplificación se muestra en la Figura 8.



**Figura 8.- Esquema de amplificación de la reacción en cadena de la polimerasa.**

**Tabla 2.- Secuencias de oligonucleótidos empleados y su temperatura de alineamiento.**

Gen	Tm	Oligonucleótido	Amplicón
WT1 Humano	58.5°C	F= 5'-AACGCCCCTTCATGTGTGC-3' R= 5'- GCTGGTCTGAACGAGAAAACCTT-3'	223pb
IL-10 Humano	58.3°C	F= 5'-CCAGCCCCTTGAGAAACCTTATTG-3' R= 5'- GCTTGGAATGGAAGCTTCTGTTGG-3'	282pb
G3PDH Humano	60.6°C	F= 5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3' R= 5'- TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3'	452pb

## **VI. V. V. Electroforesis en Gel de Agarosa**

Los productos de PCR se corrieron en un gel de agarosa al 1.2% y se observaron en un fotodocumentador proporcionado por el departamento de Genética de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia para la obtención de las imágenes de los resultados. Dichas imágenes fueron registradas y analizadas para la densitometría con el programa Image Studio Lite Ver 5.2. Los resultados fueron graficados y analizados para las diferencias significativas con el programa de Graphpad.

## **VI. VI. Transformación de *E. coli* DH5 $\alpha$**

### **VI. VI. I. Formación de Bacterias Calcio-Competentes**

Se inoculó una asada de *E. coli* DH5 $\alpha$  EN 5 mL de caldo LB (Con 10% Peptona de caseína, 5% de extracto de levadura y 5% de NaCl) a un pH de 7.2 +/- 0.2, se incubó toda la noche a 37 °C en un agitador a 300 rpm. Posteriormente se tomaron 100  $\mu$ L y se añadieron a un nuevo tubo con 5 ml de caldo LB para ser incubados durante 4 horas a 37 °C en un agitador a 300 rpm. Se centrifugaron 3 mL del caldo con bacterias y se removió el sobrenadante, se resuspendió en 1.2 mL de Cloruro de Calcio frío a 50 mM/L. Se incubó durante 20 min en hielo, se centrifugó durante 2 min a 10000 rpm y la pastilla fue resuspendida en 50  $\mu$ L de Cloruro de Calcio.

### **VI. VI. II. Transformación**

Se añadieron 5 mL de caldo LB a dos tubos de 15 mL, a uno de ellos se agregó ampicilina a una concentración de 100 ng/mL y fueron utilizados como controles de crecimiento bacteriano y como control de transformación. Se inoculó 1 $\mu$ L de bacterias *E. coli* DH5 $\alpha$  y se incubaron a 37 °C en un agitador a 300 rpm durante toda la noche.

La transformación se realizó añadiendo 1  $\mu$ g del plásmido con el RNAi-WT1 en el pellet de bacterias calcio competentes obtenido previamente, se incubó en hielo durante 1 hora con agitación cada 5 min. Se realizó un choque térmico a 37°C durante 2 min y se añadieron 200  $\mu$ L de medio sin antibiótico. Después de 30 min las bacterias transformadas

fueron transferidas a un tubo con 25 mL de medio con antibiótico para ser incubadas toda la noche a 37 °C con agitación constante.

### **VI. VI. III. Extracción a Pequeña Escala**

Se emplearon las siguientes tres soluciones:

1. Solución 1: 2.5 mL de glucosa al 1M, 1 mL de EDTA al 0.5M y 0.62 mL TrisHCl 2M a un pH de 8, aforada a 50 mL.
2. Solución 2: 8.8 mL de agua bidestilada, 200 µL de NaOH 10M y 1mL de SDS al 10%.
3. Solución 3: 6 mL de acetato de potasio 5M, 2.8 mL de agua bidestilada y 1.2 mL de ácido acético glacial.

Se tomaron 3 mL de las bacterias transformadas y se obtuvo un pellet centrifugando 2 min a 10000 rpm, la pastilla fue resuspendida en 100 µL de la solución 1. Se añadieron 200 µL de la solución 2 y se incubó durante 5 min, finalmente se añadieron 100 µL de la solución 3 y se incubó durante 3 min.

El contenido fue llevado a centrifugación durante 5 min a 10000 rpm y el sobrenadante fue transferido a otro tubo, se añadió isopropanol (0.75 volúmenes) y se incubó durante 2 min. Se centrifugó a 10000 rpm durante 15 min y se decantó el sobrenadante, la pastilla fue lavada sin resuspender con etanol al 70%, se centrifugó nuevamente durante 15 min a 10000 rpm. Se resuspendió nuevamente en etanol al 70% y se centrifugó durante 15 min a 10000 rpm. Se decantó el sobrenadante y se dejó secar la pastilla, finalmente se resuspendió en 15 µL de agua libre de DNAsas.

### **VI. VI. IV. Caracterización del Plásmido RNAi-WT1**

El plásmido cuenta con un sitio de corte para HindIII ubicado en el loop del RNAi-WT1, por lo que se determinó la concentración del plásmido y 1 µg fue digerido con la enzima HindIII. Para esto se tomaron 3 µL de la solución con el plásmido y 1U de la enzima HindIII, se añadieron a 6 µL de Buffer Green 10X diluidos en 10 µL de agua libre de

DNAsas. Finalmente se incubaron durante 1 hora a 38°C. Como control de digestión se empleó la enzima EcoRI.

Finalmente, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 0.8%. Se aplicó el plásmido sin digerir, un control de carga negativo, el plásmido digerido con HindIII y el plásmido digerido con EcoRI, los productos fueron corridos a 80V durante 1 hora.

## **VI. VI. V. Producción a Gran Escala**

Se utilizó el kit QIAGEN Plasmid Maxi Kit. Para el crecimiento se tomó una colonia de bacterias *E. coli* DH5α transformadas y se inoculó en 5 mL de caldo LB, el cual contenía ampicilina como marcador de resistencia a una concentración de 100 ng/mL, se incubó durante 8 horas a 37°C en un agitador a 300rpm. De este cultivo primario se tomaron 500 µL y se inocularon en 500 mL de caldo LB para ser incubados durante 16 horas a 37°C en un agitador a 300 rpm.

Se centrifugaron las bacterias a 6000 gravedades durante 15 min a 4 °C, el pellet fue resuspendido en 10 mL del buffer P1 que contenía RNAsa. Se agregaron 10 mL del buffer P2 y se mezcló vigorosamente por inversión, se incubó durante 5 min. Después, se añadieron 10 mL del buffer P3, se mezcló inmediatamente por inversión y se incubó en hielo durante 20 min para la precipitación.

Se centrifugó a 20000 gravedades durante 30 min a 4 °C y se removió el sobrenadante que contiene el plásmido. El sobrenadante fue centrifugado nuevamente a 20000 gravedades durante 15 min a 4 °C, se colectó el sobrenadante. La columna QIAGEN-tip 500 fue equilibrada con el buffer QBT y se dejó vaciar por gravedad, el sobrenadante obtenido fue añadido a la columna y se dejó fluir por gravedad, la columna fue lavada dos veces con 30ml del buffer QC y se eluyó el DNA con 15 mL del buffer QF.

La precipitación al DNA plasmídico colectado se realizó añadiendo 10.5 (0.7 volúmenes) de isopropanol a temperatura ambiente, se mezcló y se centrifugó inmediatamente a 15000 gravedades durante 30 min a 4 °C, el sobrenadante fue decantado con precaución. El pellet obtenido fue lavado con 5 mL de etanol al 70% a temperatura ambiente y centrifugado a 15000 gravedades durante 10 min, se decantó el sobrenadante con precaución. Finalmente

se dejó secar a temperatura ambiente durante 10 min aproximadamente y se resuspendió en buffer TE a pH de 8.0.

Se determinó el rendimiento mediante la lectura a 260 nm y se analizó la integridad mediante un corrimiento electroforético en gel de agarosa al 0.8% como fue descrito previamente.

## **VI. VII. Transfección de la línea celular A549 con RNAi-WT1**

### **VI. VII. I. Determinación de LD50 del RNAi en A549**

Se plaquearon 5000 células de la línea A549 en una placa de 96 pozos y se aplicó el plásmido codificante al RNAi-WT1 a la concentración de 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 y 1.0  $\mu\text{g/mL}$ , el efecto en la viabilidad se visualizó mediante un ensayo de MTT como se describió previamente.

### **VI. VII. II. Transfección**

La transfección en las células A549 se realizó con PEI, para esto se deben tener dos soluciones, una con PEI y otra con el plásmido codificante al RNAi-WT1 a la concentración de la LD50:

- PEI: 200  $\mu\text{L}$  de NaCl al 150 mM + 4  $\mu\text{L}$  de PEI.
- Plásmido: 200  $\mu\text{L}$  de NaCl 150 mM + 4  $\mu\text{g}$  de plásmido.

La solución de PEI se llevó al vortex durante 10 min y después se añadió a la solución con el plásmido y se agitó vigorosamente. Se dejó incubar durante 20 min y se añadieron a las células para la transfección. Luego de 24 horas se aplicaron los tratamientos de las citocinas y LPS descritos previamente y se evaluaron a las 12 horas.

Finalmente se colectó el pellet celular para la extracción de RNA y proteínas.

## **VI. VIII. Análisis estadístico**

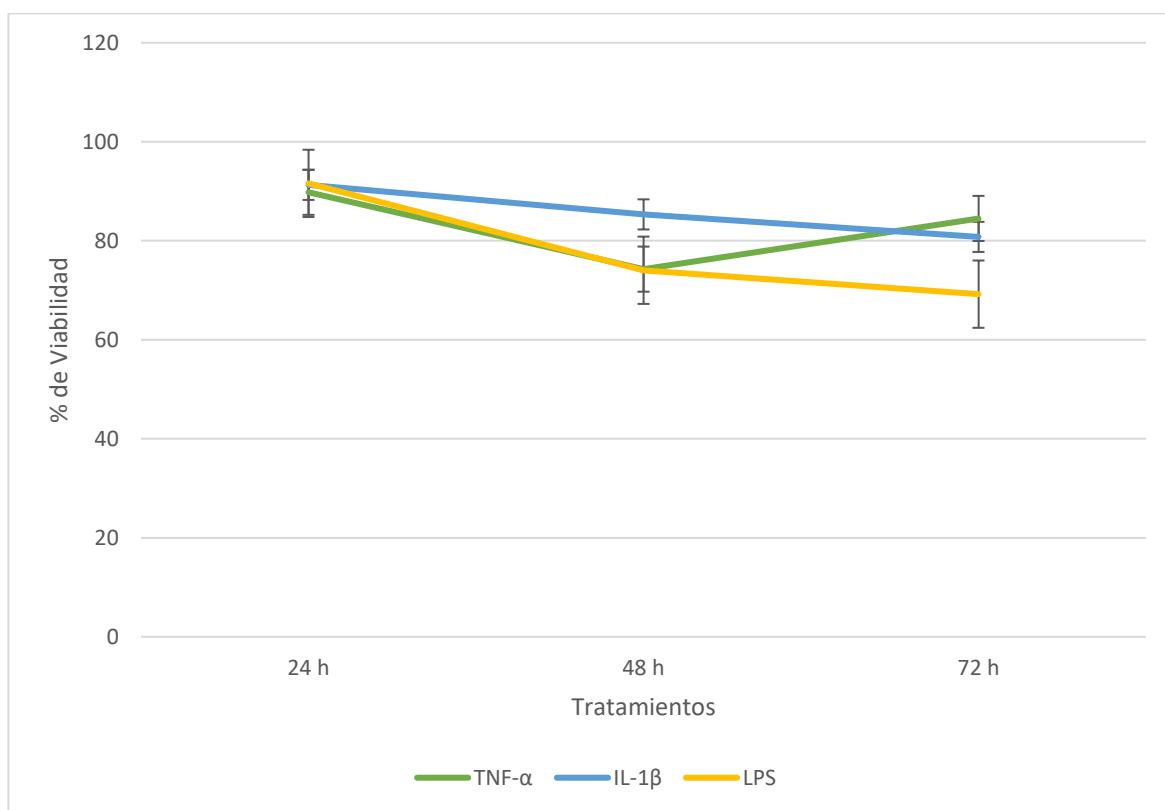
Para determinar diferencias significativas se utilizará el programa SPSS en conjunto con Graphpad para el diseño de tablas que permitan demostrar los resultados obtenidos.



## VII. RESULTADOS

### VII. I. Las Citocinas Disminuyen la Viabilidad de las Células A549:

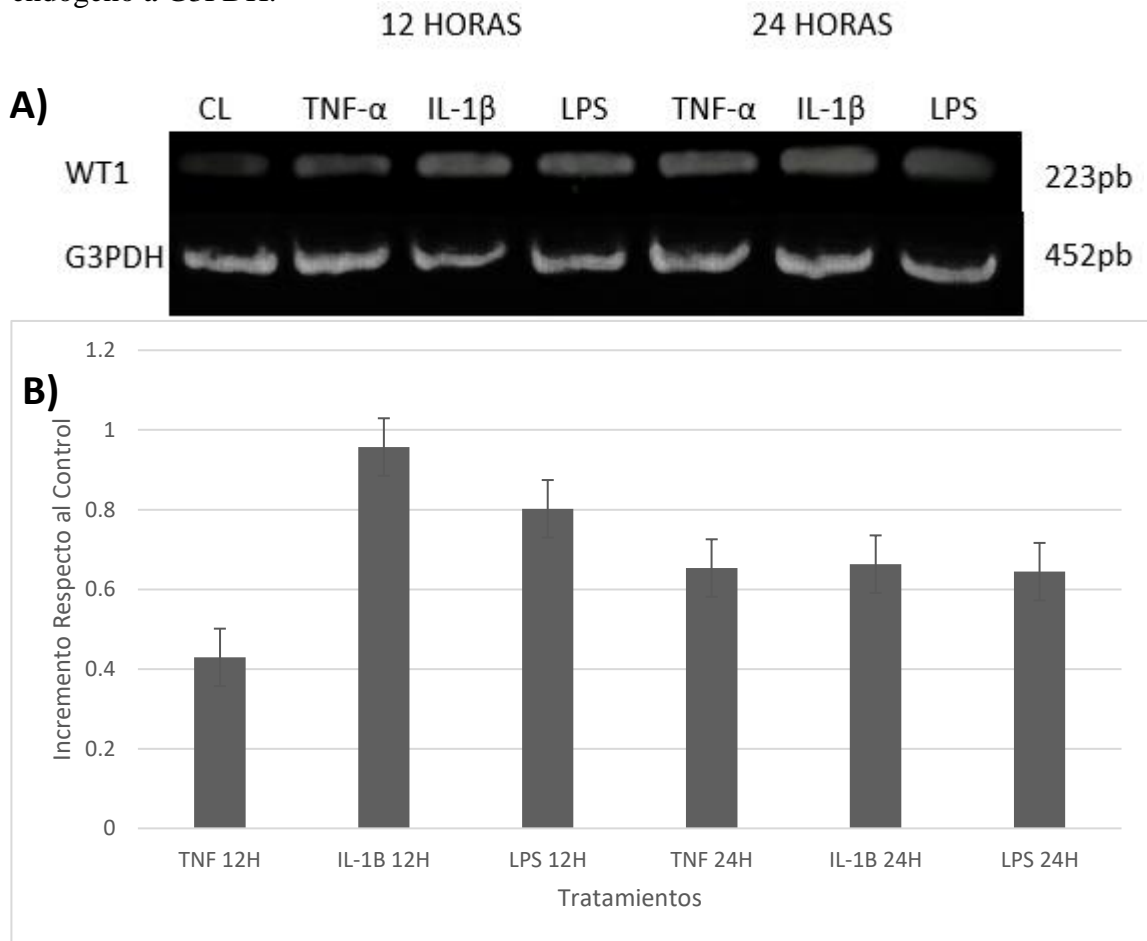
Se determinó el efecto de citocinas en la viabilidad de A549 mediante un ensayo de MTT, demostrando que los tratamientos con TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  tienen un comportamiento similar al del control positivo a las 24 horas respecto a su efecto en la viabilidad celular, sin embargo, a las 48 horas la IL-1 $\beta$  mantuvo el mismo efecto mostrado a las 24 horas, mientras que TNF- $\alpha$  y el control con LPS continuaron disminuyéndola de manera similar. A las 72 horas el control con LPS disminuyó del 75% a 65% la viabilidad, similar al resultado mostrado por la IL-1 $\beta$  que disminuyó la viabilidad del 90% al 80%, no así el efecto de TNF- $\alpha$  puesto que a las 72 horas ya comenzó a recuperarse dicha viabilidad (Figura 9).



**Figura 9.- Efecto del TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  y LPS en la Viabilidad de Células A549.** Los tratamientos con TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  disminuyen la viabilidad en células A549.

## VII. II. Las Citocinas Incrementan la Expresión de Transcritos de WT1 en Células A549:

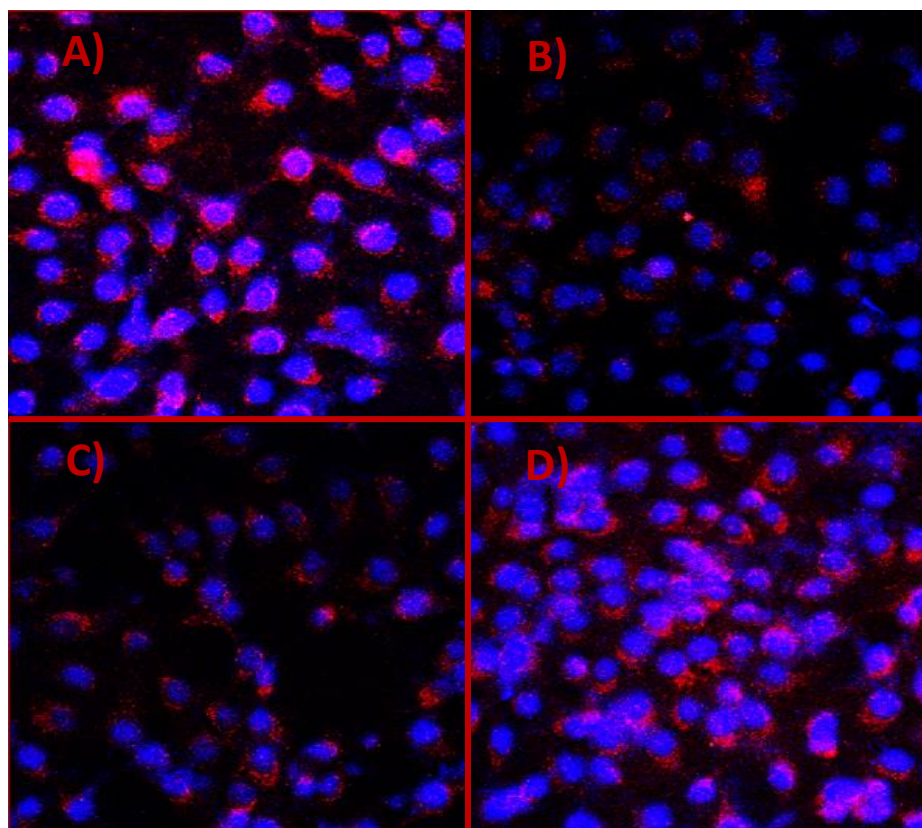
Los tratamientos con las citocinas TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  tienen la capacidad de incrementar la expresión de los transcritos de WT1 como se observa en la figura 10A, a las 12 horas después de los tratamientos con TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  se observó un incremento en la expresión de WT1 de 0.19 y 0.73 respectivamente, mientras que en el tratamiento con LPS (Control positivo), mostró un incremento en la expresión de 0.58. A las 48 horas de tratamiento, se observó un comportamiento similar entre los tratamientos, con una expresión relativa de 0.42, 0.43 y 0.42 para TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  y LPS respectivamente (Figura 10B). La normalización de densitometría de la RT-PCR se realizó utilizando como control endógeno a G3PDH.



**Figura 10.- Efecto del TNF- $\alpha$  y la IL-1 $\beta$  en los transcritos de WT1.** A) Ensayo de RT-PCR para determinar los niveles de expresión de transcritos de WT1 en un gel de agarosa al 0.8%. B) Análisis densitométrico del efecto de los tratamientos con TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  en los transcritos de WT1.

### VII. III. El TNF- $\alpha$ y la IL-1 $\beta$ modulan la Expresión y Localización de WT1 en Células A549

Para determinar cambios en la expresión y traslocación de la proteína WT1 hacia el citoplasma se realizó el ensayo de inmunofluorescencia en células tratadas con TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  por 6 horas. En las células A549 tratadas con TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  se observó la reactividad de WT1 preferentemente en el área citoplasmática comparada con el control y en LPS que presentan mayor reactividad nuclear (figura 11). En la tabla 4 se establecen las diferencias significativas entre los tratamientos. Los tratamientos con TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  mostraron una disminución significativa de la expresión de WT1 en comparación con el control sin tratamientos y con LPS, no se observó una diferencia significativa en la expresión de WT1 entre los tratamientos con TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ . Pero si se encontró una disminución significativa en la expresión de WT1 en las células tratadas con LPS respecto al control negativo. Figura 12.



**Figura 11.- Modulación de la expresión y traslocación de WT1 luego de la exposición al TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ .** Ensayo de inmunofluorescencia para WT1 utilizando DAPI como contratinción, A) Control sin tratamientos, se observa la expresión basal de WT1. B) TNF- $\alpha$  y C) IL-1 $\beta$  se observa la disminución de la expresión. En D) LPS, también disminuye la expresión.

Tabla 3.- Localización de WT1 bajo el efecto de los tratamientos.

Tratamientos	Núcleo	Perinuclear	Citoplasma
<b>CRL negativo</b>	<b>43.6%</b>	40.3%	16.1%
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	13.3%	25.1%	<b>61.6%</b>
<b>IL-1<math>\beta</math></b>	16.6%	33.3%	<b>50.1%</b>
<b>LPS</b>	<b>50.0%</b>	37.5%	12.5 %

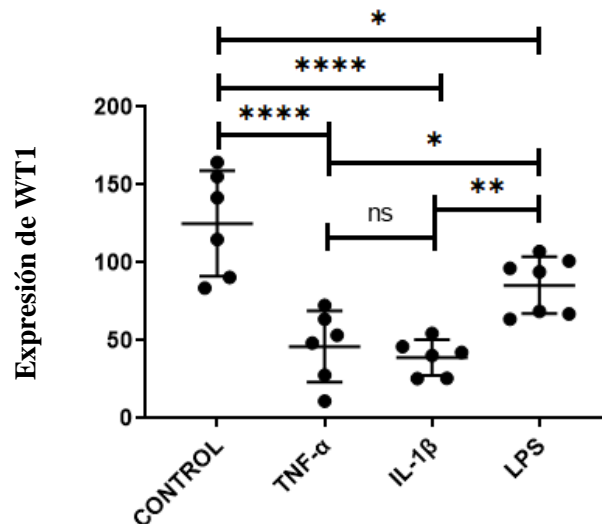
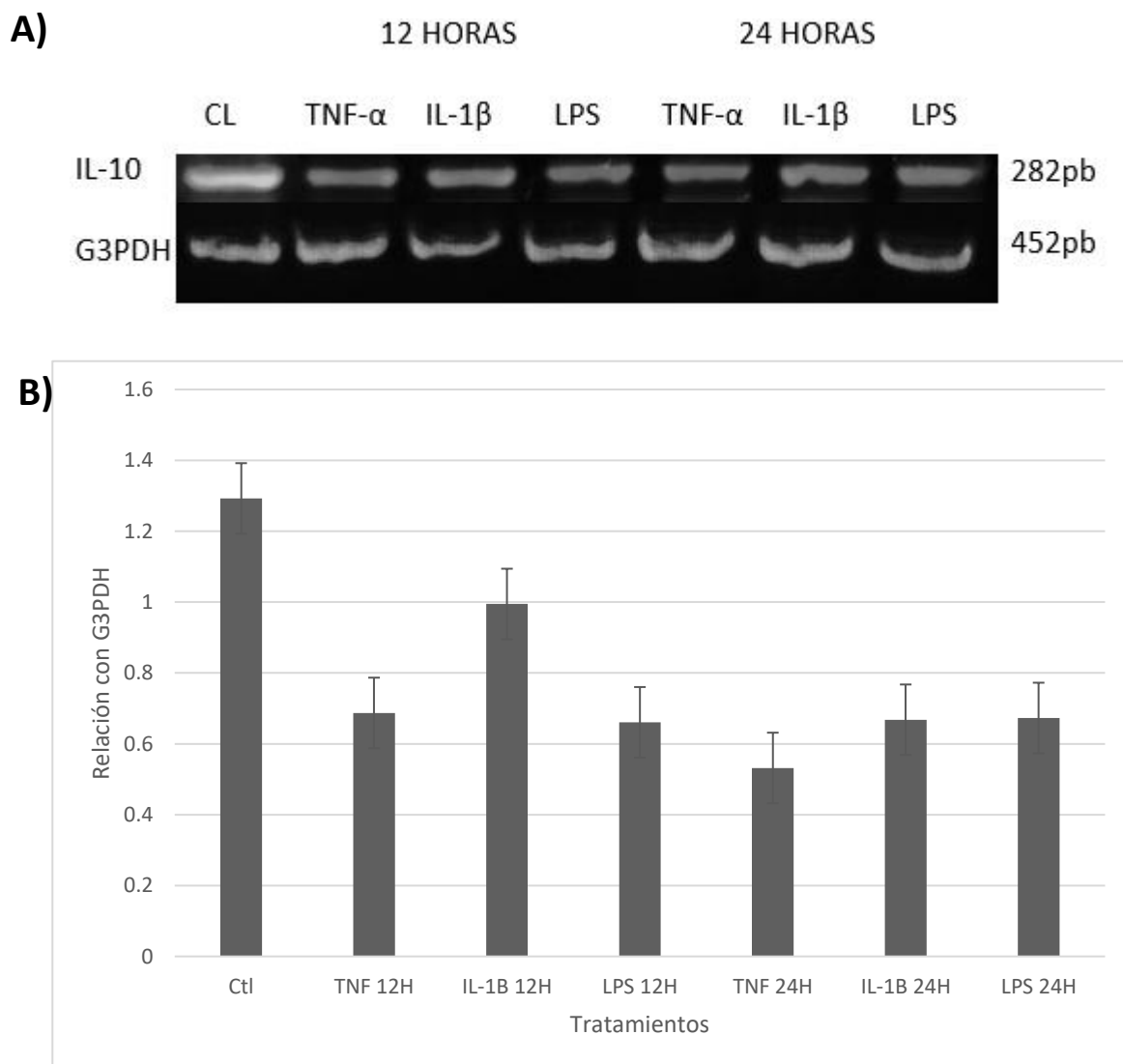


Figura 12.- Expresión de WT1 por Inmunofluorescencia.

#### VII. IV. El TNF- $\alpha$ y la IL-1 $\beta$ disminuyen la Expresión de la IL-10 en Células A549

Para determinar si las modificaciones de expresión y postransducional en WT1 ejercidas por TNF- $\alpha$  y IL-1 $\beta$  afectan la expresión de IL-10, una proteína modulada positivamente por WT1 y un miembro importante en el proceso inflamatorio, se trataron las células A549 con TNF- $\alpha$  y IL-1 $\beta$  y posteriormente se analizaron por RT-PCR, observándose como el TNF- $\alpha$  y IL-1 $\beta$  disminuyen su expresión, TNF- $\alpha$  disminuye la expresión de IL-10 (0.68) en un 46.5% con respecto al control negativo (1.27) de acuerdo al análisis de densitometría, efecto similar en la expresión (49.6%) fue encontrado con las células tratadas con el LPS (0.64) y en los tratamientos con IL-1 $\beta$  se encontró un menor efecto

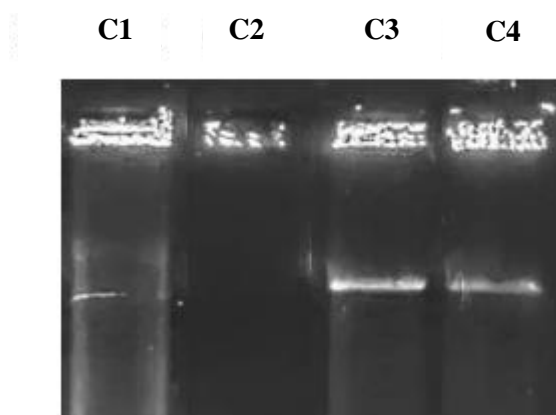
en la expresión de IL-10 (0.99) una disminución del 22% a las 12 horas. Mientras que a las 24 horas TNF- $\alpha$  reduce la expresión de IL-10 en un 50%, la IL-1 $\beta$  y LPS (0.63), reducen la expresión en 50.4% (Figura 13).



**Figura 13.- Efecto del TNF- $\alpha$  y la IL-1 $\beta$  en los transcritos de la IL-10.** A) El ensayo de RT-PCR demostró que los tratamientos disminuyen los transcritos de IL-10 en un gel de agarosa al 0.8%. B) Análisis densitométrico del efecto de los tratamientos con TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  en los transcritos de la IL-10.

## VII. V. Caracterización del plásmido RNAi-WT1

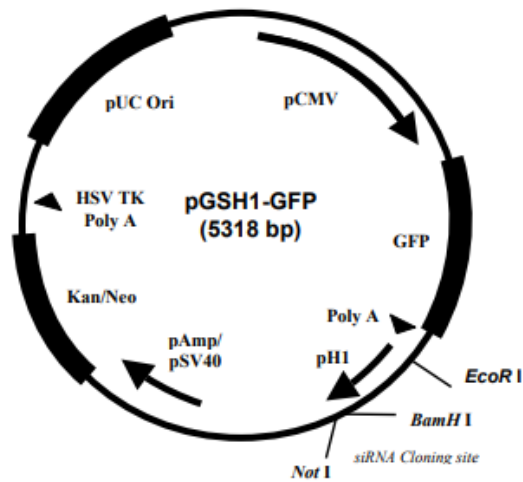
Para corroborar por otra vía si WT1 tiene un efecto en la disminución de los transcritos de IL-10 y asociar a un posible efecto modulador de carácter negativo, se usó un RNAi-WT1 para bloquear la expresión del gen WT1 en las células A549 a una LD50 de 0.27 $\mu$ g/mL y se analizaron los transcritos por RT-PCR, en la figura 14 se muestra la caracterización del plásmido con el RNAi anti-WT1 con las enzimas de restricción Hind III y EcoRI.



**Figura 14.- Caracterización del plásmido RNAi-WT1.** C1) Plásmido sin digerir. C2) Control negativo. C3) Digestión con la enzima HindIII y C4) Digestión con la enzima EcoRI.

Al plásmido pGSH1-GFP se le insertó una secuencia de RNA de interferencia anti-WT1 bajo el promotor H1 que recluta a RNA polimerasas de tipo III, además cuenta con un gen reportero proteína verde fluorescente (GFP) bajo el promotor constitutivo de citomegalovirus para su expresión fuerte. El vector también contiene los genes de resistencia a kanamicina/Neomicina tanto para células procarióticas como eucarióticas y un origen de replicación PUC Ori, como se muestra en la figura 15.

A)



B)

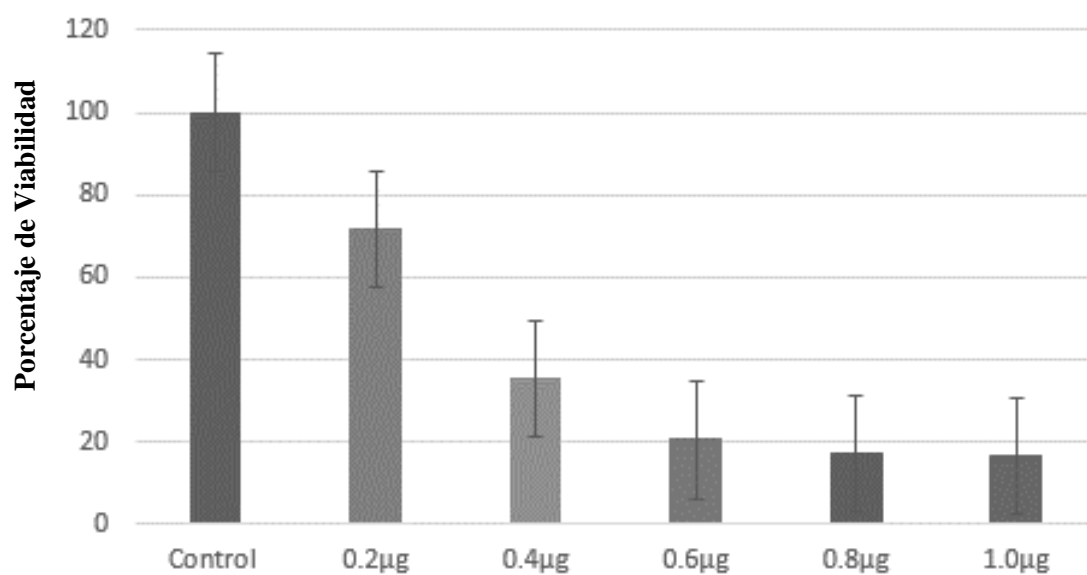
Vector Elements

Element	Start-End	Description
pCMV	59-808	human CMV promoter sequence
GFP	843-1500	Green Fluorescent Protein gene sequence
Poly A	1572-1801	Transcription stop and polyadenylation sequence
pH1 promoter	1808-1900	H1 RNA Polymerase III promoter
pAmp/pSV40	2689-3030	Ampicillin and SV40 promoters (in tandem)
Kan/Neo	3152-3942	Kanamycin and Neomycin resistance gene sequence
HSV TK Poly A	4182-4200	HSV Thymidine Kinase polyadenylation signal sequence.
pUC Ori	4531-5174	pUC origin of replication sequence.

Figura 15.- A) Mapa del plásmido pGSH1-GFP, B) Elementos que constituyen al vector.

## VII. VI. Ensayo de viabilidad en Células A549 tratadas con RNAi-WT1

Con la finalidad de bloquear la expresión del gen *wt1* en la línea celular A549 de cáncer de pulmón se realizó el ensayo de viabilidad por MTT celular con las diferentes concentraciones del plásmido, observándose una disminución de la viabilidad celular dosis dependiente como muestran en la figura 16, con una LD50 de 0.27µg/mL del RNAi-WT1.



**Figura 16.- Dosis letal del RNAi-WT1 en células A549.**



## VIII. DISCUSIÓN

Para determinar modulaciones en la expresión y localización de WT1, y si estas ejercían un efecto en la IL-10, se utilizó como modelo la línea celular A549, proveniente de un adenocarcinoma humano y perteneciente a la clasificación del cáncer pulmonar de células no pequeñas (Gao y col. 2020), la cual presentó una alta expresión basal de la IL-10 consistente con lo reportado por Gao y sus colaboradores (2020). Uno de los principales mecanismos de evasión de la respuesta inmune por parte del cáncer es la síntesis de estas proteínas anti-inflamatorias, entre sus efectos destaca la polarización de macrófagos de tipo M1 hacia M2, así como de neutrófilos de N1 a N2 (Wang y col. 2011). Consistentemente, mediante el ensayo de RT-PCR se determinó que la expresión de mRNA de la IL-10 en las células A549 fue incluso mayor a la del gen constitutivo G3PDH (1.2 veces mayor).

El análisis de la expresión basal del mRNA de WT1 mediante el ensayo de RT-PCR concuerda con reportes que indican una alta actividad transcripcional en células de carácter neoplásico (Yamagami y col, 1996; Zapata y col. 2002; Oji y col. 1999). Así mismo, la expresión basal de la proteína WT1 resultó ser relativamente alta, recientes estudios han asociado dicha expresión con una alta funcionalidad como factor de transcripción, demostrando que WT1 regula una gran cantidad de genes relacionados a la proliferación celular (Wu y col. 2019) y al proceso de apoptosis, entre ellos destaca Bcl-2 (Musalli u col. 2019).

En los ensayos de viabilidad se observó que ambos tratamientos comprometen la viabilidad celular hasta en un 16% y 20% respectivamente, comportamiento similar al del LPS que disminuye la viabilidad en un 31%. La similitud del efecto del LPS respecto a TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  en la viabilidad se puede explicar por la presencia de receptores de tipo Toll TLR-4, cuya activación repercute en la inducción de la vía de señalización de NF- $\kappa$ B y la síntesis de citocinas inflamatorias, entre ellas las mismas TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  (Verzola y col. 2020). Sun y colaboradores (2019) obtuvieron resultados similares al exponer esta línea celular a TNF- $\alpha$ , demostrando que la pérdida de la viabilidad se lleva a cabo por el mecanismo de inducción de necrosis por parte de TNF- $\alpha$ . No obstante, se ha descrito que tanto TNF- $\alpha$  como la IL-1 $\beta$  pueden disminuir la viabilidad celular por distintas vías;

primeramente, TNF- $\alpha$  cuenta con dos receptores mediante los cuales puede ejercer su efecto, TNFR1 y TNFR2. Cuando TNFR1 interactúa con TNF- $\alpha$  se recluta el complejo 1, formado por TRAF2, RIPK1 y TRADD (Al-Lamki, 2014), induciendo la activación de las cinasas PkA y PkC, mismas que fosforilan a WT1 en las serinas 365 y 393, causando a su vez la traslocación del núcleo hacia el citoplasma y disminuyendo así su actividad transcripcional (Sakamoto y col. 1997), consistentemente, el ensayo de inmunofluorescencia demostró que tanto TNF- $\alpha$  como la IL-1 $\beta$  causan dicha traslocación luego de 6 horas de exposición, el efecto no se vio reflejado en el tratamiento con LPS a pesar de que Saldanha (2019) reporta que a las 2 horas se obtiene una expresión máxima de TNF- $\alpha$  extracelular en macrófagos y Palacios (2007) demostró que con 1 hora de exposición a TNF- $\alpha$  ya es suficiente para visualizar una modificación de la localización de WT1, posiblemente las células A549 necesitan mayor tiempo de exposición al LPS para poder inducir una síntesis adecuada de TNF- $\alpha$  y otras citocinas inflamatorias para visualizar un efecto en WT1.

Para establecer una correlación entre la disminución de la actividad transcripcional de WT1 por la traslocación hacia el citoplasma con la disminución de la viabilidad celular, las células A549 fueron transfectadas con un RNAi-WT1. Se observó una dependencia de las células por WT1, puesto que el ensayo de MTT demostró que al silenciar la expresión la línea A549, pierde la viabilidad, la dosis letal media fue de 0.27  $\mu\text{g/mL}$ , estos datos concuerdan con los obtenidos por Zapata y colaboradores (2019), donde observaron una disminución de la viabilidad en las células B16F10 después del tratamiento con el RNAi-WT1, encontrando una dosis letal media de 0.45  $\mu\text{g/mL}$ . Estos resultados nos permiten observar que las células A549 son más sensibles al silenciamiento de WT1 comparado con las células B16F10.

Una vez determinada la dependencia de las células A549 por la función de WT1 y que las citocinas inducen la disminución de la expresión, así como la traslocación de núcleo a citoplasma, se evaluaron los transcritos de WT1. Con el ensayo de RT-PCR se observó un incremento significativo en los tres tratamientos, obteniendo así una inconsistencia entre el incremento de transcritos con la disminución de la proteína WT1. Esto podría deberse a una respuesta por parte de la célula ante la ausencia de la actividad transcripcional de

WT1, de manera que se induce el incremento del mRNA para recuperar la función de la proteína que está siendo secuestrada en citoplasma por el efecto de los tratamientos.

Sciesielski y su grupo de investigación (2010) demostraron que WT1 induce la síntesis de la IL-10 para mantener la homeostasis de las citocinas, se determinó un elemento de respuesta a WT1 en la región promotora de la IL-10 mediante un ensayo de movilidad electroforética. Para determinar si WT1 afecta la expresión de la IL-10 en la línea celular A549 se realizó un ensayo de RT-PCR, donde se establecieron los porcentajes de inhibición para cada tratamiento. Consistente con los resultados de la inmunofluorescencia, TNF- $\alpha$  disminuyó de manera más abrupta los transcritos de IL-10 a las 12 y 24 horas, siendo de 46.5% y 50% respectivamente. La IL-1 $\beta$  tuvo un porcentaje de inhibición menor a las 12 horas (22%), sin embargo, a las 24 horas se comportó como el tratamiento con LPS (50.4%). Arellano (2018) realizó un experimento similar en cortes histológicos renales luego de la inducción de un proceso inflamatorio sistémico *in vivo*. Donde analizaron los podocitos, células altamente especializadas ubicadas en la barrera de filtración glomerular y que expresan WT1 de manera constitutiva. De manera similar, Arellano analizó el efecto del LPS sobre WT1 y su relación con Nefrina, gen regulado positivamente por WT1. Observando que el proceso inflamatorio induce la traslocación de WT1 del núcleo al citoplasma en podocitos y que esta modulación repercute en la disminución de la expresión de Nefrina, siendo así, un resultado extrapolable a lo observado en las células A549 y su disminución de la expresión de IL-10 por la traslocación de WT1.

Así mismo, Palacios y colaboradores (2007) estudiaron el efecto de TNF- $\alpha$  en la modulación de la localización de WT1 y su relación con la expresión de la Metaloproteasa-9, gen regulado negativamente por WT1 en células endoteliales linfotrópicas (Línea celular LEC), estableciendo que luego de la exposición a TNF- $\alpha$  y la subsecuente traslocación de WT1 hacia el citoplasma, el gen de la Metaloproteasa-9 incrementa su transcripción de manera significativa. Indicando así, que el efecto de citocinas inflamatorias como TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  pueden inducir la modulación de la expresión de genes que son regulados tanto positiva como negativamente por WT1, en el caso de la

IL-10, TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  demostraron reducir los transcritos al disminuir la actividad del factor transcripcional WT1, que la regula positivamente.

En conjunto, los resultados obtenidos permitieron demostrar un mecanismo de regulación negativo entre el TNF- $\alpha$  y la IL-1 $\beta$  sobre la IL-10, posiblemente mediante la disminución de la expresión y función del factor de transcripción WT1, al traslocarlo del núcleo hacia el citoplasma. De esta manera, la viabilidad de las células A549 se ve comprometida y esto se refleja en un incremento de los transcritos de WT1 (Figura 17).

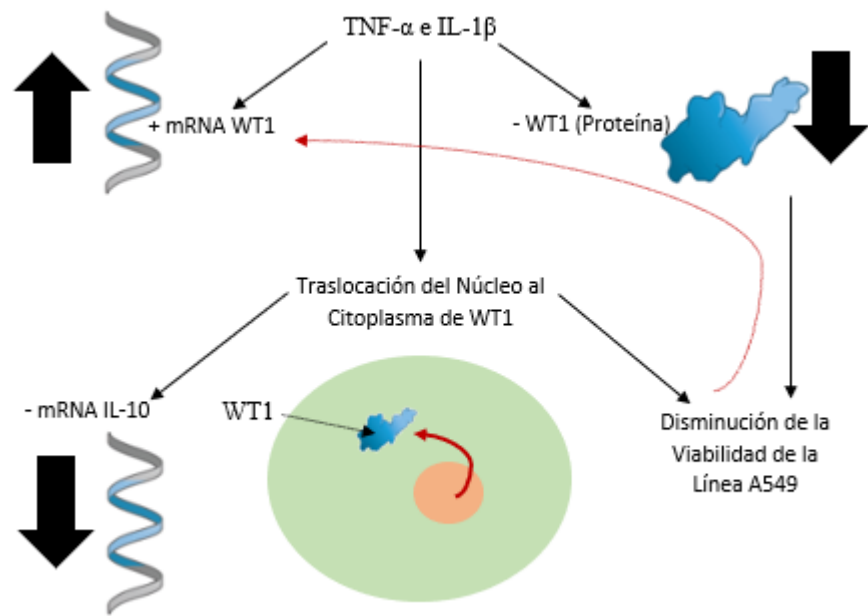


Figura 17.- Esquema de regulación de la IL-10 por el TNF- $\alpha$  y la IL-1 $\beta$  vía WT1.

## **IX. CONCLUSIONES**

La línea celular de adenocarcinoma pulmonar A549 es dependiente de la expresión y función transcripcional de WT1. TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  demostraron disminuir la viabilidad de esta línea celular mediante la disminución de la expresión de WT1 y su traslocación del núcleo al citoplasma.

Al ser traslocado al citoplasma, WT1 pierde su actividad como factor transcripcional y este efecto se observa en la disminución de los transcritos de la IL-10, en respuesta a esto, el mRNA de WT1 es incrementado posiblemente como respuesta de la célula ante la falta de la proteína WT1 funcional.

## **X. PERSPECTIVAS**

Analizar si existe una correlación del proceso inflamatorio con la modulación de WT1 y si esto tiene un efecto en el microambiente tumoral.

Analizar in vitro la modulación de WT1 y su efecto en la IL-10 luego de la exposición al TNF- $\alpha$  y la IL-1 $\beta$  en un modelo de transfección exógena y endógena de WT1.

Estudiar las cinasas luego de la exposición a TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  y correlacionar con la modulación epigenética y localización de WT1.

Determinar si el nivel de expresión de WT1 interviene en la progresión tumoral, en los niveles de citocinas plasmáticas e intratumorales y si el silenciamiento de WT1 induce un cambio en el perfil de citocinas.

Correlacionar la expresión y localización de WT1 con la presencia de IL-10 en pacientes con diferente estadio de cáncer pulmonar y su perfil de citocinas.

## **XI. BIBLIOGRAFÍA**

- Arellano Rodríguez, M. 2019. Expresión y localización de WT1 en la afección renal asociada a un proceso inflamatorio (Doctoral dissertation, Universidad Autónoma de Nuevo León).
- Autio, K., & Oft, M. 2019. Pegylated interleukin-10: clinical development of an immunoregulatory cytokine for use in cancer therapeutics. *Current oncology reports*, 21(2), 19.
- Bogdan, Christian, Yoram Vodovotz, and Cad Nathan. 1991. Macrophage deactivation by interleukin 10. *The Journal of experimental medicine* 174.6: 1549-1555.
- Croce, Carlo M. 2008. Oncogenes and cancer. *New England journal of medicine* 358.5: 502-511.
- Carmeliet, Peter, and Rakesh K. Jain. 2000. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* 407.6801: 249-257.
- del Valle, I. L. 2016. Estudio del gen WT1 en la leucemia mieloblástica aguda (Doctoral dissertation, Universitat de València).
- Gao, Y., Lu, J., Zeng, C., Yang, J., Huang, B., Zhang, N., & Fu, X. 2020. IL-10 suppresses IFN- $\gamma$ -mediated signaling in lung adenocarcinoma. *Clinical and Experimental Medicine*, 1-11.
- Graves, E. E., Maity, A., & Le, Q. T. 2010. The tumor microenvironment in non-small-cell lung cancer. In *Seminars in radiation oncology* (Vol. 20, No. 3, pp. 156-163). WB Saunders.
- Gupta, Gaorav P., and Joan Massagué. 2006. Cancer metastasis: building a framework. *Cell* 127.4: 679-695.
- Hatanaka, H., Abe, Y., Kamiya, T., Morino, F., Nagata, J., Tokunaga, T. & Yamazaki, H. 2000. Clinical implications of interleukin (IL)-10 induced by non-small-cell lung cancer. *Annals of Oncology*, 11(7), 815-819.

Heinrich, E. L., Walser, T. C., Krysan, K., Liclican, E. L., Grant, J. L., Rodriguez, N. L., & Dubinett, S. M. 2012. The inflammatory tumor microenvironment, epithelial mesenchymal transition and lung carcinogenesis. *Cancer Microenvironment*, 5(1), 5-18.

Higinbotham, Kathleen G. 1998. Deficient expression of mRNA for the putative inductive factor bone morphogenetic protein-7 in chemically initiated rat nephroblastomas. *Molecular Carcinogenesis: Published in cooperation with the University of Texas MD Anderson Cancer Center* 23.2: 53-61.

Komorniczak Michael. 2009. Imagen del Corpúsculo Renal. Consultado el 3 de Marzo del 2018.

Li, Q., Anderson, C. D., & Egilmez, N. K. 2018. Inhaled IL-10 suppresses lung tumorigenesis via abrogation of inflammatory macrophage–th17 cell axis. *The Journal of Immunology*, 201(9), 2842-2850.

Li, J. Y., English, M. A., Ball, H. J., Yeyati, P. L., Waxman, S. & Licht, J. D. 1997. Sequence-specific DNA binding and transcriptional regulation by the promyelocytic leukemia zinc finger protein. *Journal of Biological Chemistry*, 272(36), 22447-22455.

Liu, L., Ge, D., Ma, L., Mei, J., Liu, S., Zhang, Q., & You, Z. 2012. Interleukin-17 and prostaglandin E2 are involved in formation of an M2 macrophage-dominant microenvironment in lung cancer. *Journal of Thoracic Oncology*, 7(7), 1091-1100.

Musalli, M. G., Hassan, M. A., Sheikh, R. A., Kalantan, A. A., Halwani, M. A., Zeyadi, M. & Alhosin, M. 2019. Thymoquinone induces cell proliferation inhibition and apoptosis in acute myeloid leukemia cells: role of apoptosis-related WT1 and BCL2 genes. *European Journal of Cell Science*, 1(1), 2-9.

National Cancer Institute. 2018. Cancer Trends Report Update, NIH, DHHS, Bethesda, MD; [Online] Disponible en: [progressreport.cancer.gov](https://progressreport.cancer.gov).

Oji, Y., Ogawa, H., Tamaki, H., Oka, Y., Tsuboi, A., Kim, E. H., & Kishimoto, T. 1999. Expression of the Wilms' tumor gene WT1 in solid tumors and its involvement in tumor cell growth. *Japanese journal of cancer research*, 90(2), 194-204.



Oji, Y., Miyoshi, S., Maeda, H., Hayashi, S., Tamaki, H., Nakatsuka, S. I. & Shintani, Y. 2002. Overexpression of the Wilms' tumor gene WT1 in de novo lung cancers. *International Journal of Cancer*, 100(3), 297-303.

Oka, Y., Tsuboi, A., Taguchi, T., Osaki, T., Kyo, T., Nakajima, H. & Hosen, N. 2004. Induction of WT1 (Wilms' tumor gene)-specific cytotoxic T lymphocytes by WT1 peptide vaccine and the resultant cancer regression. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(38), 13885-13890.

Organización Mundial de la Salud. 2018. Cáncer Today. [Online] Disponible en: <http://gco.iarc.fr/>

Sciesielski, L. K., Kirschner, K. M., Scholz, H. & Persson, A. B. 2010. Wilms' tumor protein Wt1 regulates the Interleukin-10 (IL-10) gene. *FEBS letters*, 584(22), 4665-4671.

Sharma, S., Stolina, M., Lin, Y., Gardner, B., Miller, P. W., Kronenberg, M. & Dubinett, S. M. 1999. T cell-derived IL-10 promotes lung cancer growth by suppressing both T cell and APC function. *The Journal of Immunology*, 163(9), 5020-5028.

Shih, C. M., Lee, Y. L., Chiou, H. L., Hsu, W. F., Chen, W. E., Chou, M. C. & Lin, L. Y. 2005. The involvement of genetic polymorphism of IL-10 promoter in non-small cell lung cancer. *Lung cancer*, 50(3), 291-297.

Sun, W., Yu, J., Gao, H., Wu, X., Wang, S., Hou, Y. & Chen, X. 2019. Inhibition of lung cancer by 2-methoxy-6-acetyl-7-methyljuglone through induction of necroptosis by targeting receptor-interacting protein 1. *Antioxidants & redox signaling*, 31(2), 93-108.

Tsuboi, A., Oka, Y., Osaki, T., Kumagai, T., Tachibana, I., Hayashi, S. & Masuda, T. 2004. WT1 peptide-based immunotherapy for patients with lung cancer: report of two cases. *Microbiology and immunology*, 48(3), 175-184.

Vahl, J. M., Friedrich, J., Mittler, S., Trump, S., Heim, L., Kachler, K. & Sopel, N. 2017. Interleukin-10-regulated tumour tolerance in non-small cell lung cancer. *British journal of cancer*, 117(11), 1644.

- Verzola, D., Milanesi, S., Viazzi, F., Ansaldo, F., Saio, M., Garibaldi, S. & Esposito, P. 2020. enhanced myostatin expression and signalling promote tubulointerstitial inflammation in diabetic nephropathy. *Scientific reports*, 10(1), 1-13.
- Wang, R., Lu, M., Chen, H., Chen, S., Luo, X., Qin, Y. & Zhang, J. 2011. Increased IL-10 mRNA expression in tumor-associated macrophage correlated with late stage of lung cancer. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 30(1), 62.
- Wang, R., Zhang, J., Chen, S., Lu, M., Luo, X., Yao, S. & Chen, H. 2011. Tumor-associated macrophages provide a suitable microenvironment for non-small lung cancer invasion and progression. *Lung cancer*, 74(2), 188-196.
- Wood, S. L., Pernemalm, M., Crosbie, P. A. & Whetton, A. D. 2014. The role of the tumor-microenvironment in lung cancer-metastasis and its relationship to potential therapeutic targets. *Cancer treatment reviews*, 40(4), 558-566.
- Wu, Z., Qiu, M., Mi, Z., Meng, M., Guo, Y., Jiang, X. & Qian, D. 2019. WT1-interacting protein inhibits cell proliferation and tumorigenicity in non-small-cell lung cancer via the AKT/FOXO1 axis. *Molecular oncology*, 13(5), 1059-1074.
- Yamagami, T., Sugiyama, H., Inoue, K., Ogawa, H., Tatekawa, T., Hirata, M. & Maekawa, T. 1996. Growth inhibition of human leukemic cells by WT1 (Wilms tumor gene) antisense oligodeoxynucleotides: implications for the involvement of WT1 in leukemogenesis.
- Yang, L., Dong, Y., Li, Y., Wang, D., Liu, S., Wang, D., ... & Jiang, W. (2019). IL-10 derived from M2 macrophage promotes cancer stemness via JAK1/STAT1/NF- $\kappa$ B/Notch1 pathway in non-small cell lung cancer. *International journal of cancer*.
- Ye, Y. "Regulation of WT1 by phosphorylation: inhibition of DNA binding, alteration of transcriptional activity and cellular translocation." *The EMBO journal* 15.20 (1996): 5606-5615.
- Zapata-Benavides, P., Tuna, M., Lopez-Berestein, G. & Tari, A. M. 2002. Downregulation of Wilms' tumor 1 protein inhibits breast cancer proliferation. *Biochemical and biophysical research communications*, 295(4), 784-790.

Zapata-Benavides, P., Thompson-Armendariz, F. G., Arellano-Rodríguez, M., Franco-Molina, M. A., Mendoza-Gamboa, E., Saavedra-Alonso, S. & Rodríguez-Padilla, C. 2019. shRNA-WT1 Potentiates Anticancer Effects of Gemcitabine and Cisplatin Against B16F10 Lung Metastases In Vitro and In Vivo. *in vivo*, 33(3), 777-785.

Zeni, E., Mazzetti, L., Miotto, D., Cascio, N. L., Maestrelli, P., Querzoli, P. & Boschetto, P. 2007. Macrophage expression of interleukin-10 is a prognostic factor in nonsmall cell lung cancer. *European Respiratory Journal*, 30(4), 627-632.

Zhuang, Zhengping. 1995. Identical allelic loss on chromosome 11q13 in microdissected in situ and invasive human breast cancer. *Cancer research* 55.3: 467-471.

## **XII. RESUMEN BIOGRÁFICO**

Juan Manuel Izaguirre Alvarez

Candidato para el grado de

Maestría en Ciencias con Orientación en Inmunobiología

Tesis: EFECTO DE TNF- $\alpha$  E IL-1 $\beta$  EN LA EXPRESIÓN DE IL-10 VÍA WT1 EN LA LÍNEA CELULAR A549.

Campo de Estudio: Ciencias Biológicas.

Datos Personales: Nacido en El Mante, Tamaulipas el 24 de Febrero de 1995, hijo de Juan Manuel Izaguirre Hernández y Enriqueta Araceli Álvarez Martínez.

Educación: Egresado de la Universidad Autónoma de Nuevo León, grado obtenido Licenciado en Biotecnología Genómica en 2018.

Experiencia Profesional: Asistente de investigación en la Unidad de Biología Molecular del Cáncer del Laboratorio de Inmunología y Virología de la Facultad de Ciencias Biológicas desde 2015.